ZUR WIRKUNGSWEISE DES HERBIZIDS GLYPHOSAT: EINFLUSS AUF DIE 5-ENOLPYRUVOYLSHIKIMISÄURE-3-PHOSPHAT-SYNTHASE AUS AEROBACTER AEROGENES 62-1

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der
Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von
Hans Christian Steinrücken
aus Bergisch Gladbach

Bochum 1982

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547222_0055

Zur Wirkungsweise des Herbizids Glyphosat : Einfluss auf die 5-Enolpyruvoylshikimisäure-3-Phosphat-Synthase aus Aerobacter aerogenes 62-1

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der
Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von
Hans Christian Steinrücken
aus Bergisch Gladbach

Bochum 1982

1. Refrent : Prof. Dr. N. Amrhein
2. Referent : Prof. Dr. A. Trebst
eingereicht am : 13.10.1982
Tag der mündlichen Prüfung : 13.12.1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsverzeichnis

Seite

Abkürzungsverzeichnis VI

I. Einleitung 1

II. Material und allgemeine Methoden 7

1. Bakterienmaterial 7

2. Chemikalien 7

2.1. Radiochemikalien 7

2.2. Fein- und Biochemikalien 7

2.3. Herstellung von Shikimisäure-3-Phosphat (Ba-Salz) 8

2.4. Synthese von 5-Enolpyruvoylshikimisäure-3-Phosphat 10

2.5. Oberführung der Bariumsalze von Chorisminsäure, S-3-P und EPSP in die entsprechenden Natrium- bzw. Kaliumsalze 12

3. Radiometrische Methoden 13

4. Bestimmung des pH-Wertes 13

5. Bestimmung der Leitfähigkeit 13

6. Anzucht der Bakterien 14

7. Aufschluß der Bakterien 15

8. Enzymtestverfahren 15

8.1. Umsetzung von Shikimisäure zu Anthranilsäure 16

8.2. Umsetzung radioaktiver Shikimisäure 16

8.3. Umsetzung von Shikimisäure-3-Phosphat zu Anthranilsäure 17

8.4. Umsetzung von 5-Enolpyruvoylshikimisäure-3-Phosphat zu Anthranilsäure 17

8.5. Shikimat-Kinase 17

8.6. Anthranilat-Synthase 18

		Seite
8.7.	5-Enolpyruvoylshikimisäure-3-Phosphat-Synthase	18
8.7.1.	Hinreaktion	19
8.7.2.	Rückreaktion	22
9.	Proteinbestimmung	23
10.	Umsetzung mit alkalischer Phosphatase	23
11.	Reinigung der EPSP-Synthase aus A. aerogenes 62-1	24
11.1.	Verwendete Geräte	24
11.2.	Ammoniumsulfatfällung	24
11.3.	Wärmefällung	25
11.4.	DEAE-Cellulose-Chromatographie ..	25
11.5.	Chromatographie an Sephadex G-75.	26
11.6.	Chromatographie an CM-Cellulose und Cellulose-Phosphat	26
11.7.	Chromatofokussierung	27
11.8.	Abtrennung des Polybuffers	28
12.	Isoelektrische Fokussierung	29
13.	Polyacrylamidgel-Elektrophorese .	29
14.	Papierelektrophorese	30
15.	Bestimmung des Molekulargewichtes	30
15.1.	Gelchromatographie	30
15.2.	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	31
III.	ERGEBNISSE	32
1.	Einfluß von Glyphosat auf Enzyme des Shikimisäureweges in vitro ..	32
1.1.	Umsetzung von Shikimisäure zu Anthranilsäure	32
1.1.1.	Umsetzung ^{14}C-markierter Shikimisäure	36
1.2.	Shikimat-Kinase	39
1.3.	Umsetzung von Shikimisäure-3-Phosphat zu Anthranilsäure	40

		Seite
1.4.	Anthranilat-Synthase	42
1.5.	5-Enolpyruvoylshikimisäure-3-Phosphat-Synthase	43
1.6.	Umsetzung von 5-Enolpyruvoyl-shikimisäure-3-Phosphat zu Anthranilsäure	45
2.	Reinigung der EPSP-Synthase aus A. aerogenes 62-1	47
2.1.	Ammoniumsulfatfällung	49
2.2.	Wärmefällung	49
2.3.	DEAE-Cellulose-Chromatographie ..	49
2.4.	Chromatographie an Sephadex G-75.	50
2.5.	Chromatographie an Cellulose-Phosphat	51
2.6.	Chromatofokussierung	52
2.7.	Elektrophoretische Untersuchung der gereinigten EPSP-Synthase ...	54
2.7.1.	Elektrophorese unter nicht denaturierenden Bedingungen	54
2.7.2.	Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen	54
2.8.	Abtrennung des Polybuffers	56
3.	Eigenschaften der EPSP-Synthase aus A. aerogenes 62-1	57
3.1.	Abhängigkeit der Produktbildung von der Zeit	57
3.1.1.	Hinreaktion	57
3.1.2.	RÜckreaktion	58
3.2.	Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Proteinmenge	58
3.2.1.	Hinreaktion	58
3.2.2.	RÜckreaktion	59
3.3.	Bestimmung des Molekulargewichtes	60
3.3.1.	Ausschlußchromatographie an Sephadex G-100 Superfine	60
3.3.2.	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	61
3.4.	Bestimmung des isoelektrischen Punktes	62
3.5.	Bestimmung des pH-Optimums	64

3. 5.1. Hinreaktion 64

3. 5.2. RÜckreaktion 65

3. 6. Bestimmung des Temperatur-optimums 66

3. 7. Abschätzung der Aktivierungs-energie 67

3. 8. Versuche zur Stabilität der EPSP-Synthase 69

3. 8.1. Einfluß des pH-Wertes 70

3. 8.2. Einfluß von Puffersystemen bei pH 6.8 71

3. 8.3. Einfluß verschiedener Reagenzien. 72

3. 9. Einfluß von Kationen auf die Aktivität der EPSP-Synthase 75

3. 9.1. Erdalkali- und Schwermetallionen . 76

3. 9.2. Einfluß von Alkaliionen 77

3.10. Einfluß von Anionen auf die Aktivität der EPSP-Synthase 78

3.10.1. Anorganische Anionen 78

3.10.2. Einfluß von Puffersystemen 80

3.10.3. Einfluß des pH-Wertes 81

3.11. Bestimmung der Substratbindungs-konstanten 82

3.11.1. Hinreaktion 84

3.11.2. RÜckreaktion 93

3.12. Untersuchung zur Reihenfolge der Bindung der Substrate 96

4. Einfluß von Glyphosat und anderer Verbindungen auf die Aktivität der EPSP-Synthase 102

4. 1. Reversibilität der Hemmung durch Glyphosat 102

4. 2. Bestimmung der Inhibitorkonstan-ten und des Hemmtyps 103

4. 2.1. Hinreaktion 103

4. 2.2. Rückreaktion 106

4. 3. Einfluß des pH-Wertes auf die Hemmung durch Glyphosat 109

4. 4. Einfluß von Glyphosin, Amino - methylphosphonsäure und Imino-diessigsäure 110

Seite

4.5. Einfluß von 1-Hydroxycyclopropancarbonsäurephosphat 110

4.6. Einfluß von Fosfomycin 111

4.7. Einfluß der aromatischen Aminosäuren 111

5. Inaktivierungsversuche 112

5.1. Phenylglyoxal 113

5.2. 3-Brompyruvat 115

5.3. N-Ethyl-Maleimid (NEM) 116

IV. DISKUSSION 118

1. Oberlegungen zu den Ergebnissen dieser Arbeit 118

2. Oberlegungen zu einem möglichen Zusammenhang zwischen der Hemmung der EPSP-Synthase und der herbiziden Wirkung von Glyphosat ... 135

V. ZUSAMMENFASSUNG 139

VI. LITERATURVERZEICHNIS 143

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Aces	2-[(2-Amino-2-oxoethyl)amino]-ethansulfonsäure
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
DAHP	3-Deoxy-D-arabinoheptulosonsäure-7-phosphat
DH	Dehydrogenase
DNAse	Desoxyribonuclease
DTE	Dithioerythrit
DTT	Dithiothreit
EDTA	Ethylendiamintetraethansäure
EPS	5-Enolpyruvoylshikimisäure
EPSP	5-Enolpyruvoylshikimisäure-3-Phosphat
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IEP	Isoelektrischer Punkt
Lsg.	Lösung
ME	2-Mercaptoethanol
Mes	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
NAD	Nicotinamid-adenindinucleotid, oxidiert
NADH	Nicotinamid-adenindinucleotid, reduziert
NADPH	Nicotinamid-adenindinucleotidphosphat, reduziert
NB	Nutrient Broth

n.b.	nicht bestimmt
NEM	N-Ethylmaleimid
PEP	Phosphoenolpyruvat
Pipes	Piperazin-N-N'-bis(2-ethansulfonsäure)
RNAse	Ribonuclease
SDS	Natriumdodecylsulfat
S-3-P	Shikimisäure-3-Phosphat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
v/v	Gewichtsprozente
w/v	Gewicht/Volumen

I. Einleitung

Glyphosat (N-[Phosphonomethyl]-Glycin, Abb. 1) ist die phytotoxische Komponente des Breitbandherbizids "Roundup". Es wird auf die Blätter der zu behandelnden Pflanzen aufgesprüht und eignet sich u.a. aufgrund seiner hohen Mobilität in der Pflanze (SPRANKLE et al., 1975; SCHULZ, 1982) besonders zur Bekämpfung tief wurzelnder Pflanzen oder Rhizompflanzen wie beispielsweise der Quecke (Agropyron repens) (SPRANKLE et al., 1975; CLAUS u. BEHRENS, 1976; COUPLAND u. CASELEY, 1979; IVANY, 1981).

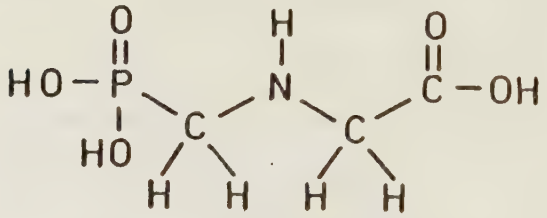


Abb. 1: Strukturformel von Glyphosat

Es verursacht in den behandelten Pflanzen ein vielfältiges Spektrum physiologischer wie morphologischer Veränderungen, an deren Ende - bei genügender Dosierung - der Tod des gesamten Organismus steht.

So wurden unter anderem die Hemmung der Phenylpropansynthese (HOLLÄNDER u. AMRHEIN, 1980), die Induktion der Phenylalanin-Ammonium-Lyase, des Schlüsselenzyms des Phenylpropanstoffwechsels (DUKE u. HOAGLAND, 1978; HOAGLAND et al., 1979; DUKE et al., 1979; COLE et al.,1980; DUKE et al., 1980), die Hemmung der Chlorophyllbiosynthese (KITCHEN et al., 1981), die Brechung der apikalen Dominanz (COUPLAND u. CASELEY, 1975; BAUR et al., 1977; BAUR, 1979) sowie eine Hemmung der Ionenaufnahme (BRECKE u. DUKE, 1980) beschrieben. Nach längerer Einwirkung werden auch Photosynthese, Atmung und Assimilattransport beeinflußt (TYMONKO u. FOY, 1978; COLE u. DODGE, 1979; SPRANKLE et al., 1975). Auf subzellulärer Ebene wurde die Zerstörung der Chloroplastenmembran und ein Anschwellen des Endoplasma-

tischen Retikulums beobachtet (CAMPBELL et al., 1976) UOTILA et al., 1980; FEDTKE, 1982).

Die toxische Wirkung von Glyphosat ist jedoch nicht auf höhere Pflanzen beschränkt ; es wirkt wachstumshemmend auch auf Bakterien und Algen (JAWORSKI, 1972; GRESSHOFF, 1979; ROISCH u. LINGENS, 1980). Von tierischen Organismen wird Glyphosat im allgemeinen auch in höheren Dosen gut toleriert. So beträgt die LD_{50} für Ratten 4,3 g/kg Körpergewicht (FRANZ, 1979).

Während in Pflanzen bisher keine nennenswerte Metabolisierung festgestellt werden konnte (PUTNAM, 1976; CHASE u. APPLEBY, 1979), wird Glyphosat im Boden relativ schnell zu untoxischen Verbindungen abgebaut, ohne dabei die Mikroflora zu schädigen (RUEPPEL et al., 1977).

Bereits 1972 fand JAWORSKI, daß Glyphosat in Lemna gibba L. und Rhizobium japonicum den endogenen Gehalt an aromatischen Aminosäuren herabsetzt. Die durch das Herbizid hervorgerufene Wachstumshemmung ließ sich andererseits durch gleichzeitige Gabe von Tyrosin und Phenylalanin - oder aller drei aromatischen Aminosäuren - aufheben.

HADERLIE et al. (1977) und GRESSHOFF (1979) konnten in analogen Versuchen an einer Reihe weiterer Organismen (E.coli, Chlamydomonas spec.; Zellkulturen von Daucus carota L., Nicotiana tabacum L. und Glycine max (L.) Merr.) ebenfalls eine Aufhebung der wachstumshemmenden Wirkung von Glyphosat durch die drei aromatischen Aminosäuren feststellen , wohingegen eine Reduzierung des Pools der freien aromatischen Aminosäuren nicht immer beobachtet werden konnte.

Jedoch führte die gleichzeitige Applikation von Glyphosat und den drei aromatischen Aminosäuren nicht in allen Fällen zu einer Unterdrückung der toxischen Wirkung des Herbizids; insbesondere gelang dies nie bei der Verwendung intakter Landpflanzen als Versuchsobjekte (DUKE u. HOAGLAND, 1978; DUKE u. HOAGLAND, 1981; COLE et al., 1980).

Auf der Grundlage seiner Fütterungsexperimente entwickelte JAWORSKI (1972) die Hypothese, daß die Toxizität von

Glyphosat auf eine Hemmung der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren, möglicherweise durch direkte Beeinflussung einer Enzymaktivität des Shikimisäureweges (siehe Abb. 2), zurückzuführen sei.

Diese Hypothese fand jedoch nicht allzu lange Beachtung, da, neben den widersprüchlichen Ergebnissen hinsichtlich der Aufhebbarkeit der wachstumshemmenden Wirkung von Glyphosat, ROISCH und LINGENS (1974) schon bald darauf zeigen konnten, daß die von JAWORSKI durch Glyphosat hemmbar vorgeschlagenen Enzyme Chorismat-Mutase und Prephenat-Dehydrogenase in zellfreien Extrakten aus E.coli durch Glyphosat nicht beeinflußt werden.

Da nur Pflanzen und Mikroorganismen, nicht jedoch Tiere die Möglichkeit besitzen, die drei aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan über den Shikimisäureweg zu synthetisieren, könnte eine Verbindung, die in der Lage ist, diesen Stoffwechsel zu hemmen, sich als "ideales", d.h. für Tiere untoxisches Herbizid erweisen.

Von diesen Gedanken geleitete Versuche, durchgeführt von BAILLIE et al. (1972), über in vitro aktive Inhibitoren der Shikimisäure-Dehydrogenase selektiv phytotoxische und als Herbizid einsetzbare Verbindungen zu erhalten, waren jedoch nicht erfolgreich.

HOLLÄNDER und AMRHEIN (1980) jedoch fanden schließlich in Fütterungsexperimenten an Fagopyrum esculentum Moench, daß Glyphosat den Einbau von radioaktiv markierter Shikimisäure in alle drei aromatischen Aminosäuren hemmt. Die applizierte Shikimisäure wurde zwar aufgenommen, aber nicht metabolisiert.

Sollte es sich hierbei um einen primären Effekt des Glyphosats handeln, so wäre anzunehmen, daß das Herbizid eines oder mehrere der drei Enzyme zwischen Shikimisäure und dem Hauptverzweigungspunkt dieses Stoffwechselweges Chorisminsäure , in seiner Aktivität herabsetzt.

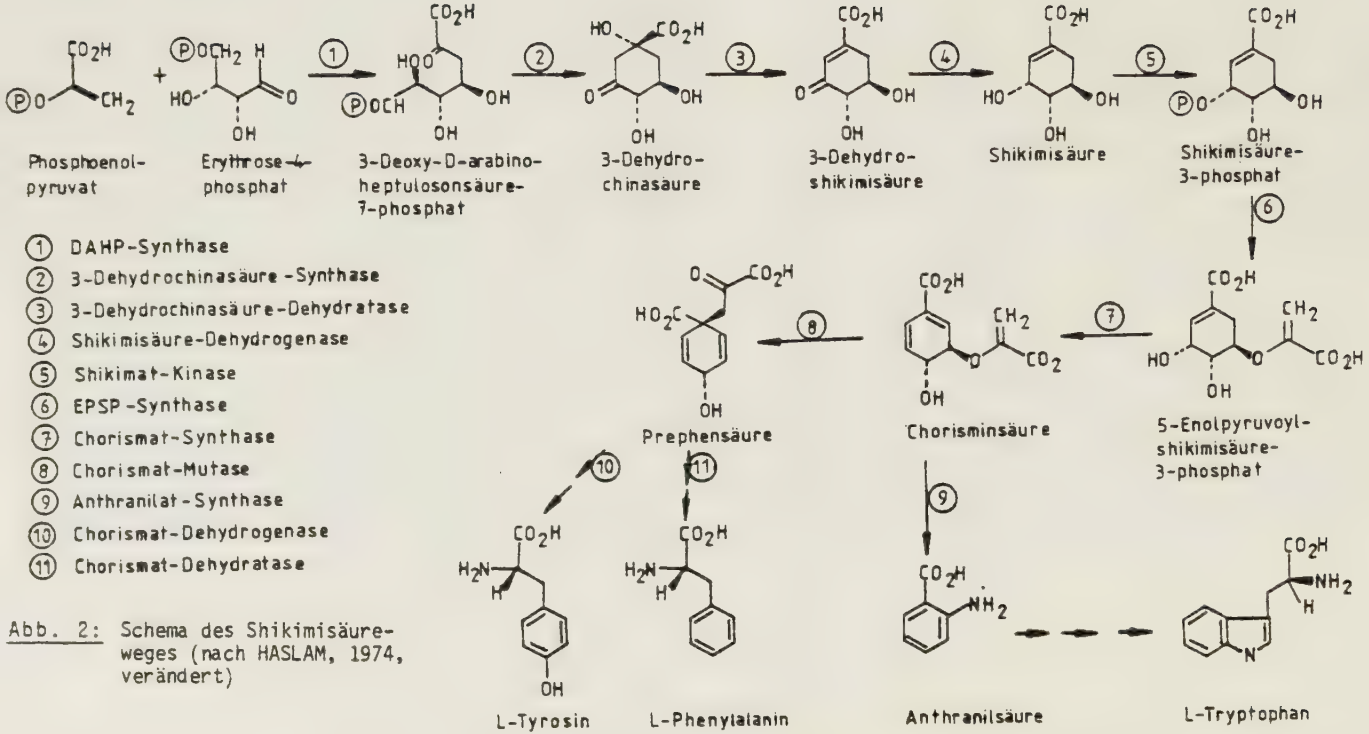


Abb. 2: Schema des Shikimisäure-weges (nach HASLAM, 1974, verändert)

Es erschien daher sinnvoll, den Einfluß von Glyphosat auf die Enzyme Shikimat-Kinase (ATP:Shikimisäure 5-Phosphotransferase, EC 2.7.1.71), 5-Enolpyruvoylshikimisäure-3-Phosphat-Synthase (Phosphoenolpyruvat:Shikimisäure-3-Phosphat Enolpyruvoyltransferase, EC 2.5.1.19; EPSP-Synthase) und Chorismat-Synthase (3-Phospho-5-enolpyruvoylshikimisäure Phosphat-Lyase, EC 4.6.1.4) in vitro zu untersuchen, da letztlich nur in zellfreien Systemen eine direkte Herbizid-Enzym-Wechselwirkung nachgewiesen werden kann.

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß Glyphosat ausschließlich die EPSP-Synthase hemmt. Dieses Enzym ist von den drei genannten das am wenigsten untersuchte. LEVIN u. SPRINSON (1964) konnten an einer 4.6fach angereicherten Präparation aus E.coli nur wenige Charakteristika bestimmen. BONDINELL et al. (1971) versuchten, mit einem 80fach angereicherten Extrakt aus Salmonella typhimurium Aufschlüsse über den Reaktionsmechanismus zu erhalten.

In höheren Pflanzen wurde das Enzym nach vergeblichen Versuchen (BERLYN et al., 1970) schließlich in Phaseolus mungo nachgewiesen (KOSHIBA, 1978). LEIFELD (1982) konnte es aus Corydalis sempervirens Zellkulturen 223fach anreichern. Eine Reinigung bis zur Homogenität wurde bis jetzt noch nicht beschrieben.

Die EPSP-Synthase katalysiert die Übertragung eines intakten Enolpyruvoyl-Restes aus Phosphoenolpyruvat (PEP) auf den Sauerstoff der 5'-OH-Gruppe des Shikimisäure-3-Phosphats (S-3-P) (BONDINELL et al., 1971). Für die Reaktion wurde ein reversibler Additions-Eliminierungs-Mechanismus vorgeschlagen (LEVIN u. SPRINSON, 1964; BONDINELL et al., 1971; siehe Abb. 3).

Bis jetzt konnte erst eine weitere enzymatisch katalysierte Reaktion beschrieben werden, in der ebenfalls ein intakter Enolpyruvoylrest übertragen wird: die Bildung von UDP-2-Acetamido-2-deoxy-3-enolpyruvoylglukose durch die Enoylpyruvat-Transferase (Phosphoenolpyruvat:UDP-2-Acetamido-2-deoxy-D-Glukose 2-Enoyl-1-carboxyethyl-

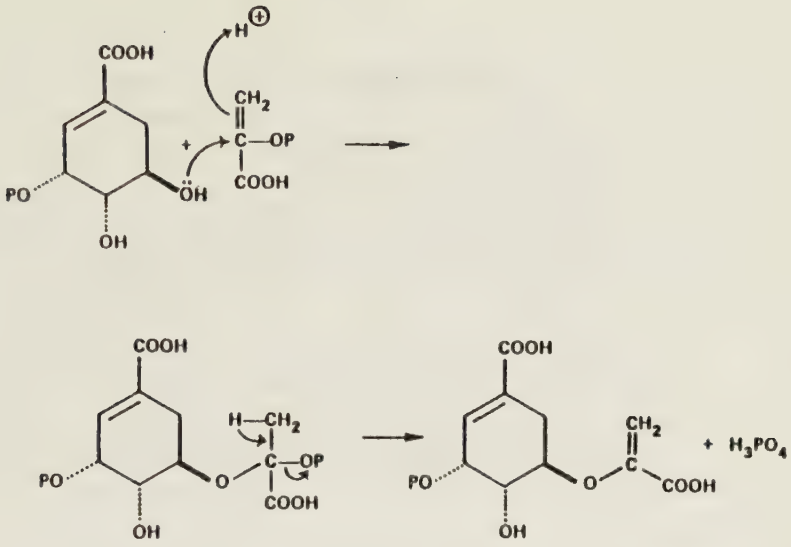


Abb. 3: postulierter Reaktionsmechanismus für die von der EPSP-Synthase katalysierten Reaktion (LEVIN u. SPRINSON, 1964)

Transferase, EC 2.5.1.7), ein Enzym, daß in der Biosynthese der bakteriellen Zellwand eine Rolle spielt (STROMINGER, 1958; GUNETILEKE u. ANWAR, 1968). Es wurde ein ähnlicher Reaktionsmechanismus vermutet wie bei der von der EPSP-Synthase katalysierten Umsetzung (BONDINELL et al., 1971; CASSIDY u. KAHAN, 1973).

Ziel dieser Arbeit war es, das durch Glyphosat hemmbare Enzym der Reaktionsfolge Shikimisäure → Chorisminsäure, die 5-Enolpyruvoylshikimisäure-3-Phosphat-Synthase, aus einer bakteriellen Quelle anzureichern, zu charakterisieren und seine Wechselwirkung mit dem Herbizid Glyphosat zu untersuchen.

II. Material und allgemeine Methoden

1. Bakterienmaterial

Aerobacter aerogenes 62-1 (Klebsiella pneumoniae ATCC 25306) stammte aus der Stammsammlung des Lehrstuhls für Pflanzenphysiologie , Ruhr-Universität Bochum.

Escherichia coli W 600 wurde freundlicherweise von Hernn Prof. Dr. Winkler, Lehrstuhl für Mikrobiologie, Ruhr-Universität Bochum, zur Verfügung gestellt.

Klebsiella pneumoniae ATCC 25597 wurde von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen.

2. Chemikalien

2.1. Radiochemikalien

G-^{14}C-Shikimisäure (0.01 mCi/0.022 mg) stammte von NEW ENGLAND NUCLEAR, Dreieichenhain.

2.2. Fein- und Biochemikalien

Er wurden bezogen:

ADP, ATP, PEP, NADH, NADPH, Combithek mit Eichprotein (Größe II), DNAse I (aus Rinderpankreas), RNAse (aus Rinderpankreas), Lactat-Dehydrogenase (aus Schweinemuskel), Pyruvat-Kinase (aus Kaninchenmuskel), alkalische Phosphatase (aus Kälberdarm) von der Fa. BOEHRINGER, Mannheim.

Rinderserumalbumin, Natriumdodecylsulfat, Acrylamid, N,N-Methylenbisacrylamid, N,N,N',N'-Tetramathylethylendiamin, Dialyseschlauch, Servalyt Precotes 3-10, Bromphenolblau, Servacel CM 32 von der Fa. SERVA, Heidelberg.

Shikimisäure von der Fa. ROTH, Karlsruhe.

Aminomethylphosphonsäure, Iminodiessigsäure, Dithioerythrit, Dithiothreit, Phenylmethylsulfonylfluorid, Hepes, Mes, Pipes, Tergitol NPX von der Fa. SIGMA, München.

Sephadex G-15, Sephadex G-75, Sephadex G-100 Superfine, Electrophoresis Calibration Kit (Low Molecular Weight), Polybuffer 74, Polybuffer-Exchanger 94 von der DEUTSCHEN PHARMACIA, Freiburg.

Cellulose-Phosphat von der Fa. WHATMAN, Springfield Mill, Maidstone, England.

Glyphosat und Glyphosin wurden freundlicherweise von der Fa. MONSANTO AGRICULTURAL PRODUCTS, St. Louis, U.S.A. zur Verfügung gestellt.

Alle übrigen Chemikalien wurden von der Fa.MERCK, Darmstadt; Lösungsmittel von der Fa. BAKER, Deventer, bezogen.

2.3. Herstellung von Shikimisäure-3-Phosphat (Ba-Salz)

Shikimisäure-3-Phosphat wurde nach einem von KNOWLES und SPRINSON (1970) leicht modifizierten Verfahren von WEISS und MINGIOLI (1956) aus dem Kulturmedium von Klebsiella pneumoniae ATCC 25597 gewonnen.

Aus 16 l Kulturmedium konnten insgesamt 16.8 g des Ba-Salzes isoliert werden.

Die Analyse des nach II.2.5. aus 502 mg Ba-Salz (≙ 1 mMol $Ba_3(S\text{-}3\text{-}P)_2 \times 5\ H_2O$) gewonnenen Na-Salzes ergab:

UV-Spektrum: ein einziges Maximum bei 215 nm.

Chromatographie auf Cellulose-Dünnschichtplatten im Laufmittel n-Butanol/Ethansäure/H_2O = 76/5/19 : unter UV-Bestrahlung ein Fleck mit dem R_f-Wert 0.06; nach Behandlung mit alkalischer Phosphatase: unter UV-Licht ein Fleck mit dem R_f-Wert 0.56 (Shikimisäure: R_f= 0.56).

Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (Geräte und Durchführung wie bei HOLLÄNDER-CZYTKO u. AMRHEIN, 1982), Detektion bei 215 nm: ein Hauptmaximum nach 79.9 min, drei sehr kleine Maxima nach 11.96 min (Shikimisäure), 24.8 min und 69.5 min (Abb.4); nach Behandlung mit alkalischer Phosphatase: ein Maximum nach 11.6 min (Shikimisäure) (Abb. 4).

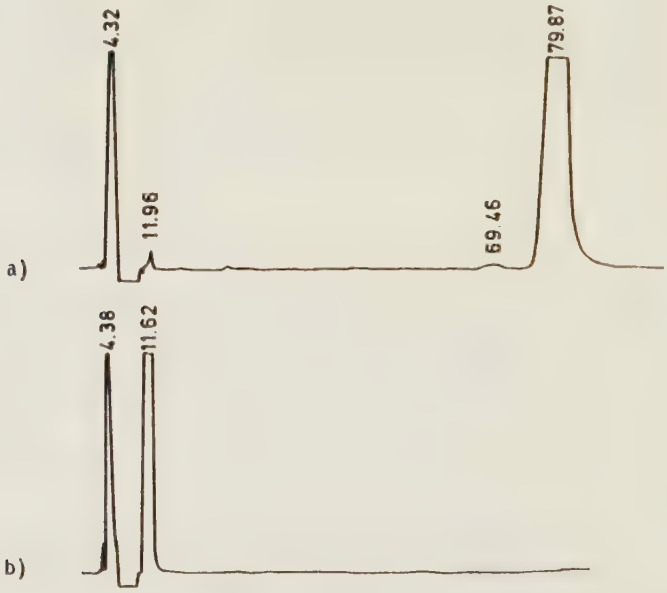


Abb. 4: Elutionsprofil der hochdruckflüssigkeitschromatographischen Untersuchung von S-3-P (Retentionszeiten in min)

a) unbehandelt

b) nach Umsetzung mit alkalischer Phosphatase

Die quantitative Auswertung ergab:

Verbindung	Gehalt in 502 mg Ba-Salz
freie Shikimisäure	0.009 mMol
Shikimisäure nach Phosphatasebehandlung	0.927 mMol
freies Phosphat[+]	0.003 mMol
Phosphat nach Phosphatasebehandlung[+]	0.910 mMol

[+]die Bestimmung von Phosphat erfolgte wie unter II.9.7.1. angegeben

2.4. Synthese von 5-Enolpyruvoylshikimisäure-3-Phosphat

EPSP wurde auf enzymatischem Wege aus S-3-P und Phosphoenolpyruvat nach einer Vorschrift von KNOWLES et al. (1970) mit Hilfe eines Rohextraktes aus E. coli W 600 erhalten.

Aus 1.5 mMol S-3-P konnten 0.78 mMol EPSP in Form des Ba-Salzes gewonnen werden (Ausbeute: 52% der Theorie, Literatur: 58% der Theorie).

Die Analyse des nach II.2.5. aus 63mg des Ba-Salzes (≙ 0.1 mMol Ba_2(EPSP) · x 2 H_2O) freigesetzten Na-Salzes ergab:
Chromatographie auf Cellulose-Dünnschichtplatten im Laufmittel 2-Butanol/Methanol/$Ammoniak_{conc.}$/H_2O = 50/35/5/10 : unter UV-Licht ein Fleck mit dem R_f-Wert 0.02; nach Behandlung mit alkalischer Phosphatase: unter UV-Licht ein Fleck mit dem R_f-Wert 0.16; nach zusätzlichem Erhitzen in 0.2 N HCl (10 min im siedenden Wasserbad): unter UV-Licht ein Fleck , der mit authentischer Shikimisäure co-

chromatographierte (R_f-Wert 0.29).

UV-Spektrum: ein Maximum bei 215 nm.

Hochdruckflüssigkeitschromatographie (Geräte und Durchführung wie bei HOLLÄNDER-CZYTKO u. AMRHEIN, 1982), Detektion bei 215 nm: ein Hauptmaximum nach 28.3 min, drei sehr kleine Maxima nach 11.8. min (Shikimisäure), 15.2 min und 77.8 min (S-3-P) (Abb. 5); nach Behandlung mit alkalischer Phosphatase: ein Hauptmaximum nach 6.8 min, zwei sehr kleine Maxima nach 26.8 und 32.3 min (Abb. 5); nach zusätzlichem Erhitzen in 0.2 N HCl (10 min im siedenden Wasserbad): ein Maximum nach 11.5 min (Shikimisäure) (Abb. 5).

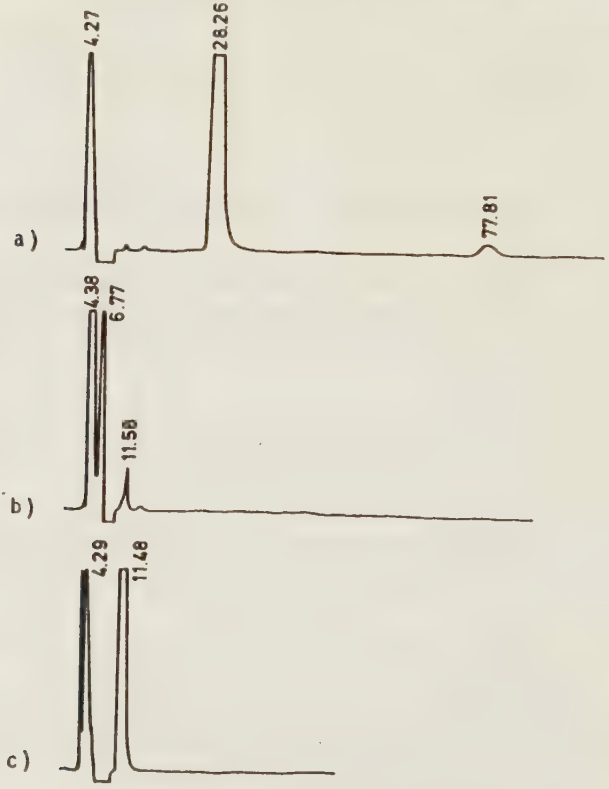


Abb. 5: Elutionsprofil der hochdruckflüssigkeitschromatographischen Untersuchung von EPSP (Retentionszeiten in min)

a) unbehandelt
b) nach Umsetzung mit alkalischer Phosphatase
c) nach zusätzlichem Erhitzen in 0.2 N HCl

Die quantitative Auswertung ergab:

Verbindung	Gehalt in 63 mg Ba-Salz
freie Shikimisäure	0.2 µMol
freies S-3-P	1.3 µMol
Shikimisäure nach Phosphatasebehandlung und Erhitzen in 0.2 N HCl	78.8 µMol
freies Phosphat^{+}	0.1 µMol
mit Phosphatase hydrolysiertes Phosphat^{+}	81.1 µMol
freies PEP und Pyruvat^{++}	0.1 µMol
Pyruvat nach Erhitzen in 0.2 N HCl^{++}	81.4 µMol

$^{+}$die Bestimmung von Phosphat erfolgte wie unter II.9.7.1. angegeben

$^{++}$PEP wurde, wie unter II.9.7.1. angegeben, bestimmt. Der Gehalt an Pyruvat wurde mit dem gleichen Ansatz, jedoch ohne Pyruvat-Kinase, ermittelt.

2.5. Oberführung der Bariumsalze von Chorisminsäure, S-3-P und EPSP in die entsprechenden Natrium- bzw. Kaliumsalze

Ba-Chorismat wurde in das K^{+}-Salz überführt, wie bei HOLLÄNDER (1979) beschrieben.

690 mg S-3-P(Ba-Salz) (≙ 1.25 mMol) bzw. EPSP(Ba-Salz) (≙ 0.1 mMol) wurden in ca. 10 ml bzw. 2 ml H_2O bidest. suspendiert und nach Zugabe von ca. 4 g bzw. 1 g Amberlite IR 120, Na^{+}-Form (frisch regeneriert), so lange im Eisbad

geschüttelt, bis sich die Salze vollständig gelöst hatten und nach Absetzen des Ionenaustauschers im Oberstand keine Ba^{2+}-Ionen mehr nachweisbar waren (Test mit halbgesättigter Na_2SO_4-Lsg. auf einem Objektträger, Beobachtung der $BaSO_4$-Kristalle im Mikroskop).

Anschließend wurde dekantiert, der Ionenaustauscher 4 mal mit H_2O bidest. gewaschen, die Oberstände vereinigt, auf 25 ml bzw. 10 ml mit H_2O bidest. aufgefüllt und filtriert. Die erhaltenen Lösungen waren 50 mM an S-3-P bzw. 10 mM an EPSP.

3. Radiometrische Methoden

Die Radioaktivität wäßriger Lösungen wurde nach Zugabe von 5 ml Quickszint 212 (Fa. W.ZINSSER, Frankfurt) im Szintillationszähler BF Betaszint 5000/300 der Fa. BERTHOLD/FRIESEKE bestimmt. Absolute Zerfallsraten wurden durch Zugabe eines internen ^{14}C-Standards (Fa. AMERSHAM/BUCHLER, Braunschweig) ermittelt. Die Radioaktivitätsverteilung auf Dünnschichtchromatogrammen wurde mit Hilfe der Dünnschichtscanner II LB 2723 und LB 2760 der Fa. BERTHOLD/FRIESEKE bestimmt.

4. Bestimmung des pH-Wertes

pH-Wert-Bestimmungen wurden mit einem SCHOTT-pH-Meter CG 818 mit angeschlossener Einstabmeßkette durchgeführt.

5. Bestimmung der Leitfähigkeit

Die Bestimmung der Leitfähigkeit erfolgte mit einem Leitfähigkeitsmesser Type CDM 2e der Fa. RADIOMETER, Kopenhagen.

6. Anzucht der Bakterien

Alle nachfolgenden Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Gefriergetrocknetes Bakterienmaterial wurde mit 1 ml NB-Medium (DIFCO) aufgenommen, mit der entstandenen Bakteriensuspension zwei 50 ml Erlenmeyerkolben, die je 10 ml NB-Medium enthielten, angeimpft und die Gefäße 24 h bei 30°C auf dem Wasserbadschüttler (Fa. NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC CO., New Brunswick, New Jersey, U.S.A.) inkubiert. Danach wurde auf NB-Schrägagarröhrchen (DIFCO) überimpft, diese 24 h bei 30°C inkubiert und anschließend bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Alle 4 Wochen wurden die Kulturen auf neue NB-Schrägagarröhrchen übertragen.

Von den Schrägagarröhrchen wurden vor Gebrauch Subkulturen angelegt (10 ml NB-Medium in 50 ml Erlenmeyerkolben), aus denen dann während der logarithmischen Phase in die jeweiligen Medien überimpft wurde.

Zur Gewinnung von Bakterien für den Zellaufschluß wurde aus der Vorkultur in 1 l Medium nach VOGEL und BONNER (1956) modifiziert nach EGAN und GIBSON (1970) in einen 5 l Erlenmeyerkolben überimpft (Inocculum 10 ml), 8 h bei 30°C auf dem Rundschüttler inkubiert und mit dem gesamten Inhalt ein 50 l Schlaufenfermenter, der 49 l des gleichen, jedoch nicht sterilisierten Mediums enthielt, angeimpft. Es wurde bei 30°C so lange inkubiert, bis das Bakterienwachstum in die stationäre Phase übergegangen war. Im Anschluß daran wurden die Bakterien mit einer Durchlaufzentrifuge (Fa. CHRIST, Typ UJ 15000) abzentrifugiert, gewogen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C gelagert.

Die durchschnittliche Ausbeute betrug 240 g Bakterien/ 50 l Medium. Für Vorversuche wurden die Bakterien in 1 l des gleichen Mediums in 5 l Erlenmeyerkolben angezogen, nach Erreichen der stationären Phase mit einer Sorvall RC-5 Superspeed-Kühlzentrifuge abzentrifugiert und wie oben be-

schrieben, eingefroren und gelagert.

7. Aufschluß der Bakterien

Die Bakterien wurden im gefrorenen Zustand durch eine auf -20°C vorgekühlte Bio-X-Presse, Typ X 25 (Fa. AB BIOX, Nacka, Schweden) gegeben, anschließend mit der 4fachen Menge 0.2 M Tris/HCl-Puffer pH 7.8, der 5 mM 2-Mercaptoethanol und 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid enthielt, versetzt und nach Zugabe von 1 mg DNAse und 0.5 mg RNAse/l Puffer ca. 50 min bei Raumtemperatur gerührt.

Danach wurden Zellwandreste 35 min bei 35000 g in einer Sorvall RC-5 Superspeed-Kühlzentrifuge (Rotor: SS 34) abzentrifugiert; der Oberstand diente als Enzymquelle und wurde - wenn nicht sofort weiterverwendet - in 2 ml Portionen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C gelagert. Über ein Jahr konnte keine Abnahme der EPSP-Synthase-Aktivität festgestellt werden.

Kleine Mengen Bakterien (weniger als 10 g) wurden nach Suspendierung in der 4fachen Menge obigen Puffers 6 mal 2 min im Eisbad mit dem Ultraschall-Desintegrator (BRANSON-Sonifier S 215) behandelt und anschließend wie oben zentrifugiert.

Hinsichtlich spezifischer und absoluter Aktivität der EPSP-Synthase konnte zwischen den auf diese beiden Arten gewonnenen Rohextrakten kein Unterschied festgestellt werden.

8. Enzymtestverfahren

Wenn nicht anders erwähnt, wurden alle Ansätze in 1.5 ml Polyethylengefäßen ausgeführt.
Der pH-Wert der an den jeweiligen Reaktionen beteiligten Lösungen wurde durch Zugabe von HCl oder NaOH auf den pH des jeweils verwendeten Puffers eingestellt.

Die Extinktionsmessungen wurden mit dem PM 6-Photometer der Fa. ZEISS durchgeführt.

8.1. Umsetzung von Shikimisäure zu Anthranilsäure

Die Umsetzung von Shikimisäure zu Anthranilsäure erfolgte modifiziert nach MORGAN et al. (1963). Der Reaktionsansatz enthielt in 1 ml Gesamtvolumen:

Shikimisäure	1 µMol
ATP	2 µMol
$MgCl_2$	5 µMol
PEP	2 µMol
NADH	2 µMol
L-Glutamin	5 µMol
Tris/HCl pH 8.2	50 µMol

Der Ansatz wurde 5 min bei 37°C vorinkubiert. Nach dem Start der Reaktion durch Zugabe von 50 µl Rohextrakt wurde weiter bei 37°C inkubiert und zu den angegebenen Zeiten mit 0.1 ml 12 N HCl abgestoppt.

Die Bestimmung der gebildeten Anthranilsäure erfolgte wie bei GIBSON und GIBSON (1964) nach Extraktion in 4 ml Ethansäureethylester durch Messung der Extinktion bei 336 nm.

8.2. Umsetzung radioaktiver Shikimisäure

Der Reaktionsansatz enthielt die gleichen Verbindungen wie in II.8.1. in den gleichen Konzentrationen, jedoch in einem Gesamtvolumen von 0.1 ml, dazu 0.05 µCi G-^{14}C-Shikimisäure. Es wurde nicht mit HCl, sondern durch Erhitzen im siedenden Wasserbad (1 min) abgestoppt.

8.3. Umsetzung von Shikimisäure-3-Phosphat zu Anthranilsäure

Die Umsetzung von S-3-P zu Anthranilsäure und deren quantitative Bestimmung erfolgte wie unter II.8.1. angegeben, indem anstelle von Shikimisäure 1 µMol S-3-P eingesetzt und ATP und $MgCl_2$ fortgelassen wurden.

8.4. Umsetzung von 5-Enolpyruvoylshikimisäure-3-Phosphat zu Anthranilsäure

Es wurde im wesentlichen wie unter II.8.1.angegeben verfahren. Anstelle von Shikimisäure wurde 1 µMol EPSP eingesetzt; ATP, $MgCl_2$ und PEP wurden fortgelassen.

8.5. Shikimat-Kinase

Die Bestimmung der Shikimat-Kinase erfolgte in Anlehnung an KOSHIBA (1978). Der Testansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 50 µl:

G-^{14}C-Shikimisäure,sp.Akt. 0.4 Ci/ Mol	0.05 µMol
$MgCl_2$	0.25 µMol
ATP	0.1 µMol
Tris/HCl pH 8.2	2.5 µMol

Der Ansatz ohne Enzym wurde 5 min bei 37°C vorinkubiert, anschließend durch Zugabe von 5 µl Rohextrakt gestartet und bei 37°C inkubiert. Nach unterschiedlichen Zeiten wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 µl 1 N HCl gestoppt, ausgefallenes Protein 5 min bei 92000 g in einer Eppendorfzentrifuge 5414 abzentrifugiert, der gesamte Überstand auf WHATMAN Nr. 3-Chromatographiepapier aufgetragen, das Chromatogramm im Laufmittel n-Butanol/Ethansäure/H_2O = 76/5/19 entwickelt und die Radioaktivitätsverteilung mit

dem Dünnschichtscanner ermittelt. Die radioaktive Bande mit einem R_f-Wert zwischen 0 und 0.15 wurde herausgeschnitten und die Radioaktivität in spin-thimbles 5 mal mit 0.2 ml H_2O eluiert. Das Eluat wurde auf 1 ml aufgefüllt und Aliquots von 0.1 ml zur Radioaktivitätsbestimmung verwendet.

Die Identifizierung des Reaktionsproduktes erfolgte durch dünnschichtchromatographischen Vergleich mit authentischem S-3-P vor und nach der Phosphatase-Behandlung. Es konnte in zwei verschiedenen Laufmitteln (Butanol/Ethansäure/H_2O = 76/5/19 und 2-Butanol/Methanol/$Ammoniak_{conc.}$/H_2O = 50/35/5/10) kein Unterschied festgestellt werden.

8.6. Anthranilat-Synthase

Die Aktivität der Anthranilat-Synthase wurde ermittelt, wie bei EGAN und GIBSON (1970) beschrieben. Die Konzentration der Anthranilsäure wurde jedoch nicht fluorometrisch, sondern über die Extinktion bei 336 nm wie in II.8.1. beschrieben, ermittelt.

8.7. 5-Enolpyruvoylshikimisäure-3-Phosphat-Synthase

Von den vier an der Reaktion der EPSP-Synthase beteiligten Verbindungen können prinzipiell alle für eine Aktivitätsbestimmung herangezogen werden.

$$\text{S-3-P} + \text{PEP} \rightleftharpoons \text{EPSP} + P_i$$

Während für die quantitative Erfassung von PEP und P_i eine ganze Reihe von Verfahren vorgeschlagen wurden, gibt es für EPSP und S-3-P kaum praktikable Methoden.

Denkbar wäre eine Bestimmung mittels HPLC, da mit diesem Verfahren beide Verbindungen getrennt und über ihre Absorption bei 215 nm quantitativ erfaßt werden können (siehe

II.2.3. und II.2.4.) . Mit der dort verwendeten Methode schien dies jedoch viel zu zeitaufwendig, da S-3-P eine Retentionszeit von ca. 80 min hatte.

Alle verwendeten Verfahren greifen daher auf die Bestimmung von PEP und P_i zurück.

8.7.1. Hinreaktion

Die Geschwindigkeit der Hinreaktion kann sowohl über das Verschwinden von PEP als auch über die Zunahme von P_i quantitativ erfaßt werden. So ist es möglich, die Abnahme der PEP-Konzentration nach Abstoppen der Reaktion mit einem gekoppelten optischen Test zu verfolgen.

Es ist jedoch sinnvoller, die Mengen eines entstandenen Produktes zu bestimmen, da geringe Änderungen der Substratkonzentration vor einem hohen Substrathintergrund nur schlecht und mit geringer Präzision erkannt werden können.

Im Falle der EPSP-Synthase kommt hinzu, daß aufgrund der verwendeten Testsysteme die Bestimmung von P_i mit viel größerer Empfindlichkeit, viel billiger und schneller erfolgen kann als die Bestimmung von PEP. Jedoch ist für die Anwendung eines Phosphat-Tests Voraussetzung, daß in der als Enzymquelle verwendeten EPSP-Synthase-Präparation weitere Enzyme, die aus den beiden Substraten P_i freisetzen, z.B. Phosphatasen, nicht anwesend sind. Da dies erst nach dem Reinigungsschritt 3 (DEAE-Cellulose-Chromatographie , siehe III.2.3.) der Fall war, mußten alle Messungen im Rohextrakt mit dem PEP-Test durchgeführt werden; in allen anderen Fällen wurde die Enzymaktivität über die Bestimmung von P_i ermittelt.

a. Bestimmung des Verbrauches von PEP (PEP-Test)

Diese Methode, die Aktivität der EPSP-Synthase zu bestimmen, beruht auf einem von LEVIN und SPRINSON (1964) vorgeschlagenen und von GOLLUB et al. (1967) modifizierten Verfahren.
Der Reaktionsansatz enthielt in einem Volumen von 0.1 ml:

Shikimisäure-3-Phosphat	0.5 µMol
Phosphoenolpyruvat	0.5 µMol
KF	0.5 µMol
Tris/Maleinsäure/NaOH pH 6.7	5.0 µMol

Es wurde 5 min bei 30°C vorinkubiert und dann die Reaktion durch Zugabe des Enzyms gestartet. Nach unterschiedlichen Zeiten wurde der Reaktionsansatz 1 min im siedenden Wasserbad erhitzt und anschließend sofort in Eis gestellt. Eventuell ausgefallenes Protein wurde 10 min in einer Eppendorfzentrifuge 5414 bei 9400 g abzentrifugiert und 50 µl des Oberstandes in den Testansatz zur PEP-Bestimmung eingesetzt. Es wurde in jedem Falle eine Kontrolle ohne S-3-P durchgeführt. Alle ermittelten Werte beruhen mindestens auf Vierfachbestimmungen sowohl des eigentlichen Meßwertes als auch der Kontrolle.

Der Testansatz zur PEP-Bestimmung enthielt in einem Volumen von 2 ml:

Tris/HCl pH 7.4	100 µMol
KCl	100 µMol
$MgSO_4$	4 µMol
ADP	1 µMol
NADH	0.4 µMol
Pyruvat-Kinase	2.5 µMol
Laktat-Dehydrogenase	2.5 µMol

Nach Stillstand der Reaktion (ca. 15 min bei Raumtemperatur) wurde die Extinktion bei 340 nm mit dem Photometer bestimmt. Die verbrauchte Menge PEP ergab sich aus der Differenz je eines Ansatzes mit und ohne S-3-P.

KF wirkt hemmend auf die im Rohextrakt enthaltenen Phosphatasen (LEVIN u. SPRINSON, 1964); auf die Aktivität der EPSP-Synthase hatte es keinen Einfluß.

b. Phosphat-Bestimmung

Die quantitative Bestimmung des Reaktionsproduktes P_i erfolgte mit geringen Abänderungen nach einer von LANZETTA et al. (1979) beschriebenen Methode, die die Bildung eines blaugrünen Komplexes zwischen Malachitgrün und Phosphomolybdat zur Grundlage hat (ITAYA u. UI, 1966).

Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes war wie in II.8.7.2a beschrieben, jedoch ohne KF.

Nach 5 min Vorinkubation bei 30°C wurde die Reaktion durch Zugabe der Enzymlösung gestartet. Das Abstoppen erfolgte durch Zugabe von 1 ml Phosphatreagenz (0.33 g Malachitgrün, 1.03 g Ammoniumheptamolybdat, 20 ml Tergitol NPX in 1 l 1 N HCl; Zubereitung wie bei HESS und DERR (1975) beschrieben).

Nach 1 min wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 0.2 ml einer 34%igen Na_3-Citrat-Lösung (w/v) beendet und die Extinktion nach frühestens 90 min bei 660 nm in Polystyrol-Halbmikroküvetten im Photometer bestimmt.

Diese Methode wurde nur dann angewendet, wenn bei der Inkubation der Enzymlösung mit jeweils nur einem der beiden Substrate keine Phosphatfreisetzung beobachtet werden konnte. Da zwischen einem Ansatz mit abgekochtem Enzym und einem zum Zeitpunkt t=0 abgestoppten Ansatz auch nach längerer Inkubation (40 min) kein Unterschied hinsichtlich des P_i-Gehaltes festgestellt werden konnte, wurde als Nullwert in der Regel ein zum Zeitpunkt des Reaktionsbeginns abgestoppter Ansatz verwendet.

Wurden die Grundparameter des Enzymtests (Temperatur, pH-Wert) verändert, so wurde stets eine Kontrolle mit Puffer anstelle des Enzyms durchgeführt.

8.7.2. Rückreaktion

Der zeitliche Verlauf der Rückreaktion ließ sich kontinuierlich durch Messung des während der Reaktion gebildeten PEPs mit einem gekoppelten optischen Test verfolgen (siehe II.8.7.1.).

Der Reaktionsansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 0.5 ml:

K-Phosphatpuffer pH 6.8	10 µMol
EPSP	0.1 µMol
$MgCl_2$	1 µMol
NADH	0.2 µMol
ADP	0.5 µMol
Pyruvat-Kinase	2.5 µMol
Laktat-Dehydrogenase	2.5 µMol

Die Ansätze wurden in Halbmikro-Quarzküvetten 10 min bei 30°C vorinkubiert, anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe der EPSP-Synthase gestartet und die Extinktionsänderung bei 340 nm im Photometer (ZEISS PM 6) mit angeschlossenem Punktschreiber bestimmt. Der Küvettenhalter wurde durch einen Thermostaten auf 30°C temperiert.

Als Nullwert diente jeweils ein Ansatz ohne EPSP-Synthase.

Eine Verdopplung der Konzentrationen aller im Reaktionsansatz vorhandenen Verbindungen - mit Ausnahme der Substrate - hatte auch bei niedrigen Substratkonzentrationen (P_i = 0.5 mM, EPSP = 20 µM) keinen Einfluß auf die Enzymaktivität.

Ohne Pyruvat-Kinase konnte keine Abnahme der Extinktion bei 340 nm beobachtet werden. Eine Freisetzung von Pyruvat aus EPSP fand unter den gegebenen Bedingungen daher nicht statt.

Wurden die Grundparameter (Temperatur, pH-Wert) des Testsystems verändert, so wurde jeweils durch Zugabe von 5 µMol PEP am Ende der Reaktion geprüft, ob die Folgereaktionen nicht die Geschwindigkeit des Gesamtumsatzes limitierten.

9. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte in der Regel nach der Methode von BRADFORD (1976) und SPECTOR (1978) unter Verwendung des BIORAD Protein-Assay-Konzentrats in einem Gesamtvolumen von 1.1 ml.

Bei einem Teil der Bestimmungen wurde auch der Proteintest nach LOWRY et al. (1951) modifiziert nach BENSADOUN und WEINSTEIN (1976) angewendet. Als Standard diente hier Rinderserumalbumin. Wurde auch in der Proteinbestimmung nach BRADFORD Rinderserumalbumin als Standard benutzt, so ergaben Proteinbestimmungen eines Rohextraktes aus A. aerogenes 62-1 doppelt so hohe Proteinwerte wie bei der Anwendung des Verfahrens nach LOWRY et al..

Dies dürfte auf die unterschiedliche Fähigkeit verschiedener Proteine zurückzuführen sein,den Farbstoff zu binden, so daß der Extinktionskoeffizient von der Art des verwendeten Standard-Proteins abhängt (PIERCE u. SUELTER, 1977).

Um eine Vergleichbarkeit beider Methoden sicherzustellen, wurde die Proteinbestimmungsmethode nach BRADFORD mit einem Rohextrakt (nach Ammoniumsulfatfällung und Dialyse) aus A. aerogenes 62-1 standardisiert, dessen Proteingehalt vorher nach dem LOWRY-Verfahren bestimmt worden war.

10. Umsetzung mit alkalischer Phosphatase

Die umzusetzende Verbindung wurde in wäßriger Lösung in einen Reaktionsansatz pipettiert, der in 0.1 ml Gesamtvolumen folgende Verbindungen enthielt :

Tris/HCl pH 8.5	5 µMol
$MgCl_2$	0.1 µMol
$ZnCl_2$	0.01 µMol
alkalische Phosphatase	10 µg

Die Inkubation erfolgte bei 30°C im Wasserbad bis zur vollständigen Umsetzung des Substrates.

11. Reinigung der EPSP-Synthase aus A. aerogenes 62-1

Alle Trennungsschritte wurden, wenn nicht anders angegeben, bei 4°C im Kühlraum durchgeführt.

11.1. Verwendete Geräte

Fraktionskollektor Ultrorac (Typ 7000) mit Uvicord II Detector (Typ 8301), Uvicord II Netzteil (Typ 8303), Vario Perpex Pumpe (Typ 1200), Ultrograd Gradientenmischer (Typ 11300) mit Rührvorrichtung und Mischventil; alle Teile von Fa. LKB, Bromma, Schweden. Zentrifuge: Kühlzentrifuge Sorvall RC-5 Superspeed, Fa. DU PONT, Wiesloch.

11.2. Ammoniumsulfatfällung

Der nach II.7. aus 50 g Bakterien gewonnene Rohextrakt wurde langsam unter Rühren im Eisbad mit fein gemörsertem Ammoniumsulfat versetzt (24.3 g / 100 ml) und dann noch 30 min gerührt, das Präzipitat anschließend 10 min bei 35000 g (SS 34- Rotor) abzentrifugiert. Zum Oberstand wurden weitere 13.2 g Ammoniumsulfat / 100 ml Extrakt hinzugegeben und nach weiterem Rühren (20 min) abermals 10 min bei 35000 g zentrifugiert. Das Sediment wurde in ca. 80 ml Puffer aufgenommen (20 mM Tris/HCl pH 7.8; 5 mM 2-Mercaptoethanol) und die klare Lösung über Nacht gegen 5 l des gleichen Puffers dialysiert.

11.3. Wärmefällung

Nach der Dialyse wurde der Rohextrakt 30 min auf 30°C im Wasserbad erwärmt und anschließend 30 min in Eis gestellt. Das Präzipitat wurde 10 min bei 35000 g (SS 34-Rotor) abzentrifugiert und verworfen.

11.4. DEAE-Cellulose-Chromatographie

Ca. 50 g vorgequollene DEAE-Cellulose (DE 52, Fa. WHATMAN) wurden mit einem Oberschuß 0.2 M Tris/HCl pH 7.8 versetzt, nach 1 h wurde dann der Oberstand abdekantiert.

Zur Entfernung feinster Partikel wurde der Ionenaustauscher dann 3 mal mit dem 10fachen Volumen 0.02 M Tris/HCl pH 7.8 versetzt, umgeschwenkt und der Oberstand nach jeweils 20 min Stehen abdekantiert.

Die Cellulose wurde in die Säule gefüllt und über Nacht mit 0.02 M Tris/HCl pH 7.8, 5 mM 2-Mercaptoethanol (ME) äquilibriert.

Der Extrakt wurde auf die Säule gegeben, der Austauscher mit ca. 100 ml Puffer nachgewaschen und gebundene Proteine mit einem linearen Gradienten von 0 bis 0.2 M KCl eluiert.

Säulencharakteristika:

Säulenabmessung	20 x 2.4 cm
Querschnittsfläche	4.52 cm^2
Betthöhe	12 cm
Bettvolumen	54 ml
Pumpgeschwindigkeit	1 ml/min
Lineare Durchflußrate	0.22 cm/min
Laufzeit	Elution: 16 h
Fraktionsvolumen	10 ml
Anzahl der Fraktionen	100
Elutionspuffer	linearer KCl-Gradient in 20 mM Tris/HCl pH 7.8, 5 mM ME , Gesamtvol. 1 l

11.5. Chromatographie an Sephadex G-75

40 g Sephadex G-75 wurden in 1 l Puffer (s.u.) gegeben, 3 h im siedenden Wasserbad erhitzt, abgekühlt und in die Säule gegeben und über Nacht mit 1 l entgastem Puffer äquilibriert.

Die vereinigten Fraktionen aus II. 11.4. wurden unter Rühren im Eisbad mit fein gemörsertem Ammoniumsulfat versetzt (56.1 g / 100 ml), 30 min weiter gerührt und anschließend 10 min bei 35000 g(SS 34-Rotor) zentrifugiert. Das Sediment wurde in möglichst wenig Puffer resuspendiert und vorsichtig auf die Säule aufgetragen.

Säulencharakteristika:

Säulenabmessung	120 x 2.4 cm
Querschnittsfläche	4.52 cm^2
Betthöhe	107 cm
Bettvolumen	484 ml
Pumpgeschwindigkeit	0.5 ml/min
lineare Durchflußrate	0.11 cm/min
Laufzeit	16 h
Fraktionsvolumen	5 ml
Anzahl der Fraktionen	100
Äquilibrierungs- und Elutionspuffer	20 mM Tris/Maleinsäure/ NaOH, 5 mM EDTA, 1 mM DTE, pH 6.8

11.6. Chromatographie an CM-Cellulose und Cellulose-Phosphat

CM-Cellulose (Servacel CM 32) und Cellulose-Phosphat wurden in einem Überschuß an Puffer (s.u.) mindestens 24 h gequollen, dann jeweils 3 mal abwechselnd mit 0.1 M Tris/ HCl pH 9.0, 1 M NaCl und 0.1 M Citronensäure/NaOH pH 4.0, 1 M NaCl (jeweils so lange, bis der pH-Wert im Überstand konstant war) gewaschen, in getrennte Säulen gefüllt und mit Puffer über Nacht äquilibriert.

Die EPSP-Synthase-haltigen Fraktionen aus II.11.5. wurden zusammengegeben und über Nacht gegen 5 l 10 mM Tris/Maleinsäure/NaOH, 10 mM 2-Mercaptoethanol dialysiert. Dann wurde die Enzympräparation mit 10 mM Tris/Maleinsäure auf pH 5.9 eingestellt und ohne Verzögerung auf die hintereinander angeordneten Säulen (in Flußrichtung zuerst CM-Cellulose, unmittelbar dahinter Cellulose -Phosphat) aufgegeben. Beide Säulen wurden mit 50 ml Puffer nachgewaschen, dann nur die Cellulose-Phosphat-Säule mit 1 M KCl eluiert. In den Fraktionsgläschen, in denen 1 ml 0.2 M Tris/Maleinsäure/NaOH, 1 mM EDTA pH 6.8 vorgegeben war, wurde jeweils sofort der pH-Wert überprüft und gegebenenfalls mit NaOH auf pH 6.8 nachgestellt.

Säulencharakteristika:	CM-Cellulose	Cellulose-Phosphat
Säulenabmessung	15 x 0.8 cm	20 x 2.4 cm
Querschnittsfläche	0.5 cm^2	4.52 cm^2
Betthöhe	8 cm	15 cm
Bettvolumen	4 ml	68 ml
Pumpgeschwindigkeit	1 ml/min	
lineare Durchflußrate	2 cm/min	0.22 cm/min
Laufzeit	ca. 3 h	
Fraktionsvolumen		5 ml
Anzahl der Fraktionen		40
Äquilibrierungs-, Aufgabe- und Waschpuffer	10 mM Tris/Maleinsäure/NaOH pH 5.9, 1 mM DTE	
Elutionspuffer	20 mM Tris/Maleinsäure/NaOH, 5 mM EDTA, 1 mM DTE, 1 M KCl, pH 7.0	

11.7. Chromatofokussierung

Sephadex G-15 wurde 1 h im siedenden Wasserbad erhitzt, nach dem Abkühlen in eine Säule gefüllt (Bettvolumen mindestens 3 mal Probevolumen) und mit Aufgabepuffer äquilibriert (Pumpgeschwindigkeit 1 ml / min).

Dann wurden die vereinigten EPSP-Synthase-haltigen Fraktionen aus II.11.6. über die Sephadex G-15-Säule gegeben. Die Protein-haltigen Fraktionen wurden dann auf die äquilibrierte Chromatofokussiersäule aufgetragen und sofort mit Polybuffer eluiert. Das Eluat wurde möglichst schnell mit NaOH auf pH 6.8 eingestellt, die Enzym-haltigen Fraktionen wurden vereinigt und bis zur weiteren Verwendung nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -18°C gelagert.

Säulencharakteristika:

Säulenfüllung	Polybuffer Exchanger 94
Säulenabmessung	30 x 0.8 cm
Querschnittsfläche	0.5 cm^2
Betthöhe	27 cm
Bettvolumen	13.5 ml
Pumpgeschwindigkeit	Aufgabe:1 ml/min;Elution:2 ml/min
lineare Durchflußrate	Aufgabe:2 cm/min;Elution:4 cm/min
Laufzeit	ca. 3h
Fraktionsvolumen	4 ml
Anzahl der Fraktionen	50
Äquilibrierungs- und Probenaufgabepuffer	25 mM Imidazol/HCl pH 6.8, 1 mM DTE
Elutionspuffer	Polybuffer 74, 1:8 verd. mit HCl auf pH 4.0 eingestellt, 200 ml 1 mM DTE

11.8. Abtrennung des Polybuffers

10 g Sephadex G-75 wurden behandelt, wie unter II.11.5. beschrieben und in eine Säule gefüllt. 2 ml der in II.11.7. erhaltenen EPSP-Synthase-Präparation wurden vorsichtig auf das Gel aufgegeben. Nach beendeter Elution wurden die Enzym-haltigen Fraktionen vereinigt und über Nacht gegen 5 l 20 mM Hepes/NaOH, 1 mM EDTA, 1 mM DTE, pH 6.8 dialysiert.

Säulencharakteristika:

Säulenabmessung	40 x 1.4 cm
Querschnittsfläche	1.54 cm^2
Betthöhe	30 cm
Bettvolumen	46 ml
Pumpgeschwindigkeit	0.3 ml/min
lineare Durchflußrate	0.19 cm/min
Laufzeit	4h
Fraktionsvolumen	1 ml
Anzahl der Fraktionen	50
Äquilibrierungs- und Elutionspuffer	0.2 M Hepes/NaOH, 1 mM EDTA, 1 mM DTE, pH 6.8

12. Isoelektrische Fokussierung

Die Dünnschicht-Isoelektrische Fokussierung wurde auf Servalyt-Precotes 3-10, 125 x 125 mm (Fa. SERVA, Heidelberg) entsprechend der Benutzungsanleitung bei 2°C durchgeführt. Als Spannungsquelle und Kühlvorrichtung diente eine Pherograph-Original-Frankfurt, Type "Mini" 65 - Papier-Elektrophorese-Apparatur der Fa. HORMUTH-VETTER, Wiesloch. Die Anfärbung der Gele erfolgte mit Serva Blau G wie in der Benutzungsanleitung für Servalyt Precotes beschrieben.

13. Polyacrylamidgel-Elektrophorese

SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurde in 1.5 mm dicken Flachgelen (10 x 13 cm) bei Raumtemperatur durchgeführt, wie bei LAEMMLI (1970) beschrieben.

Zur Elektrophorese unter nicht denaturierenden Bedingungen wurde Gel- und Puffersystem Nr. 5 nach MAURER (1968) verwendet; sie wurde ebenfalls in 1.5 mm dicken Flachgelen (10 x 13 cm) bei 4°C im Kühlraum durchgeführt.

Als Spannungsquelle diente in beiden Fällen ein Gerät der Fa. CAMAG, Typ 67800.

Zur Anfärbung wurden die Gele nach 30 min Fixierung in 12.5% Trichlorethansäure und 30 min Spülen in 10%iger Ethansäure für 3 h in eine Färbelösung (1 g Serva Blau G, 454 ml 50% Methanol, 46 ml Ethansäure in 1 l Lösung; WEBER und OSBORN, 1969) gegeben und danach bis zur vollständigen Entfärbung der nicht Protein-haltigen Gelbereiche in einem Ethansäure/Methanol/H_2O-Gemisch (75/50/875) vorsichtig geschüttelt. Die Lagerung erfolgte in 10%iger Ethansäure.

Die Farbstoffverteilung in den Gelen wurde bei 620 nm mit einem Gel-Scanner (ISCO, Modell 659) ermittelt.

14. Papierelektrophorese

Papierelektrophorese wurde in 0.2 M Methansäure-Ethansäure-Puffer pH 2.0 durchgeführt. Als Spannungsquelle und Kühlvorrichtung diente das unter II.12. angegebene Papierelektrophorese-Gerät.

15. Bestimmung des Molekulargewichtes

15.1. Gelchromatographie

Sephadex G-100 Superfine wurde in 1 l Puffer (s.u.) gegeben und 3 h im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Gel in die Säule gefüllt und über Nacht mit 1 l Puffer äquilibriert. In 1 ml der nach II.11.7. gewonnenen EPSP-Synthase-Präparation wurden je 1 mg der verschiedenen Eichproteine (Fa. BOEHRINGER, Combithek) gelöst und das Proteingemisch vorsichtig auf die Säule aufgetragen.

In den aufgefangenen Fraktionen wurden - neben der Bestimmung der EPSP-Synthase-Aktivität - zur Lokalisierung der Eichproteine der Proteingehalt bestimmt.

Säulencharakteristika:

Säulenabmessung	1.4 x 110 cm
Querschnittsfläche	1.54 cm^2
Betthöhe	100 cm
Bettvolumen	150 ml
Pumpgeschwindigkeit	0.15 ml/min
lineare Durchflußrate	0.1 cm/min
Laufzeit	17 h
Fraktionsvolumen	1 ml
Anzahl der Fraktionen	150
Äquilibrierungs- und Elutionspuffer	20 mM Hepes/NaOH, 0.2 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTE, pH 6.8

15.2. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese und Färbung der Gele wurde durchgeführt wie in II.13. beschrieben. Als Eichproteine wurde der Low Molecular Weight Electrophoresis Calibration-Kit (PHARMACIA) verwendet.

III. Ergebnisse

1. Einfluß von Glyphosat auf Enzyme des Shikimisäureweges in vitro

1962 beschrieben MORGAN et al., daß zellfreie Extrakte von Aerobacter aerogenes und Escherichia coli in der Lage seien, Shikimisäure in Anwesenheit der notwendigen Kosubstrate zu Anthranilsäure umzusetzen, die aufgrund ihrer Absorption bei 336 nm leicht quantitativ photometrisch bestimmt werden kann. Das Schema der Gesamtreaktion ist in Abb. 6 dargestellt.

Die Verwendung einer von GIBSON und GIBSON (1964) isolierten C-auxotrophen Mutante, A. aerogenes 62-1, die u.a. nicht in der Lage ist, Chorisminsäure in Prephensäure zu überführen, als Enzymquelle sollte sicherstellen, daß die eingesetzte Shikimisäure in Anwesenheit eines Oberschusses der Kosubstrate quantitativ zu Anthranilsäure umgesetzt wird.

Die quantitative Bestimmung der gebildeten Anthranilsäure in An- und Abwesenheit von Glyphosat sollte erlauben, einen möglichen Einfluß des Herbizids auf eines der drei Enzyme zwischen Shikimisäure und Chorisminsäure, und darüber hinaus noch auf die Anthranilat-Synthase (Chorismat Pyruvat-Lyase, EC 4.1.3.27), zu erkennen.

Eine Untersuchung von Teilen dieser Reaktionskette oder von einzelnen Enzymen sollte es dann möglich machen, einen solchen Effekt einem oder auch mehreren dieser Enzyme zuzuordnen.

1.1. Umsetzung von Shikimisäure zu Anthranilsäure

Der zeitliche Verlauf der Bildung von Anthranilsäure aus Shikimisäure durch zellfreie Extrakte aus A.aerogenes 62-1 war durch eine 5minütige lag-Phase und einen nachfolgenden linearen Anstieg gekennzeichnet. Die Reaktion war nach

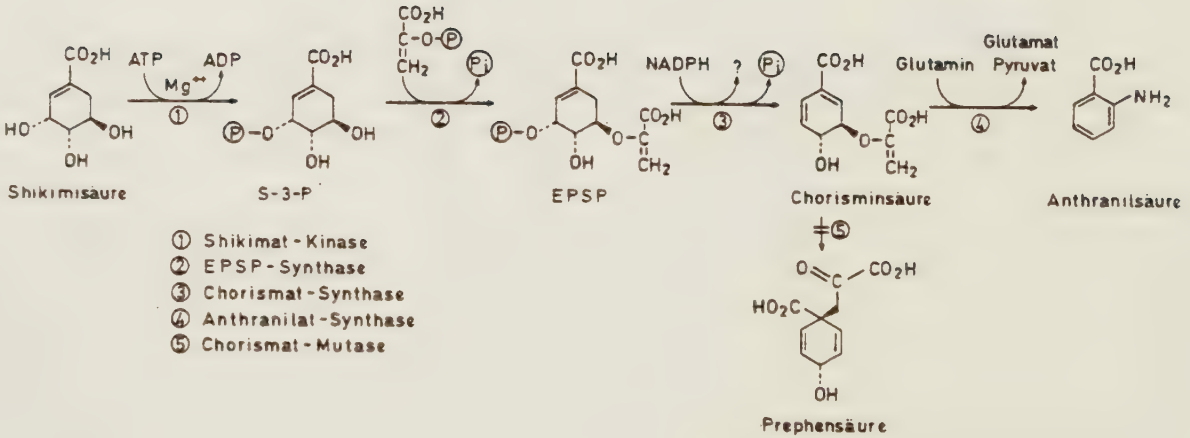


Abb. 6 : Reaktionsschema der Umsetzung von Shikimisäure zu Anthranilsäure (verändert nach HASLAM, 1974)

etwa 75 min beendet (Abb. 7); zu diesem Zeitpunkt waren ca. 85% der eingesetzten Shikimisäure zu Anthranilsäure umgesetzt.

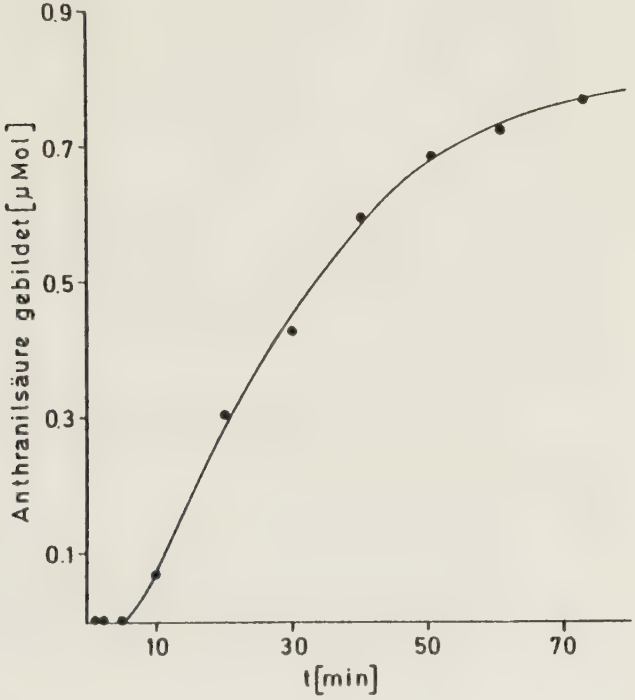


Abb. 7 : zeitlicher Verlauf der Bildung von Anthranilsäure aus Shikimisäure durch Rohextrakt aus A. aerogenes 62-1

Der Umsatz von Shikimisäure zu Anthranilsäure wurde bereits durch geringe Glyphosatkonzentrationen stark herabgesetzt: 50% Hemmung konnte bei einer Herbizidkonzentration von 5 µM gemessen werden (Abb. 8 , Reaktionszeit: 40 min).

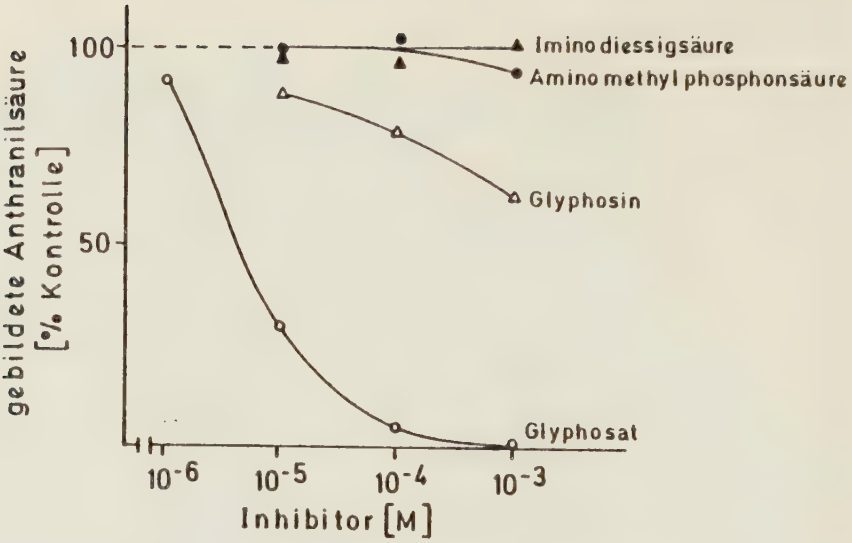
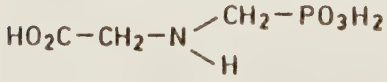
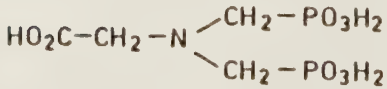
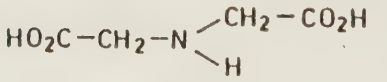


Abb. 8: Einfluß von Glyphosat und strukturverwandter Verbindungen auf die Bildung von Anthranilsäure aus Shikimisäure durch Rohextrakt aus A. aerogenes 62-1

Glyphosin, Iminodiessigsäure und Aminomethylphosphonsäure (Abb. 9), Verbindungen mit Glyphosat-ähnlichen Strukturen, hatten in entsprechenden Konzentrationen keinen oder nur einen schwachen (Glyphosin) Einfluß auf die Reaktion (Abb. 8).


Glyphosat


Glyphosin


Iminodiessigsäure

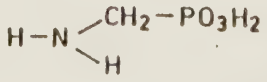

Aminomethylphosphonsäure

Abb. 9 : Strukturformeln von Glyphosat, Glyphosin, Iminodiessigsäure und Aminomethylphosphonsäure

1.1.1. Umsetzung ^{14}C-markierter Shikimisäure

Der Einsatz ^{14}C-markierter Shikimisäure im gleichen System führte während einer 90minütigen Inkubation zur Bildung einer Verbindung, die auf Zellulose-Dünnschicht-Platten in verschiedenen Laufmitteln auf gleicher Höhe mit authentischer Anthranilsäure lief und auch unter UV-Licht die gleiche hellblaue Fluoreszenz aufwies (Abb.10). In Anwesenheit von 1mM Glyphosat akkumulierte statt dessen ein Produkt, dessen R_f-Wert in den gleichen Trennverfahren mit demjenigen von Shikimisäure-3-Phosphat (S-3-P) und 5-Enolpyruvoylshikimisäure-3-Phosphat übereinstimmte (Abb.10). Es konnte jedoch kein Laufmittel gefunden werden, daß eine sichere dünnschichtchromatographische Unterscheidung zwischen diesen beiden Verbindungen ermöglichte.

Um sicherzustellen, daß es sich bei diesem Produkt um ein Intermediat des Shikimisäureweges und nicht etwa um ein kovalentes Glyphosat-Addukt oder das Ergebnis einer Seitenreaktion handelte, wurde es papierelektrophoretisch von Glyphosat abgetrennt und anstelle von Shikimisäure in einen zweiten Ansatz ohne Glyphosat eingesetzt. Es entstand wiederum eine Verbindung, die sich hinsichtlich ihres dünnschichtchromatographischen Verhaltens und ihrer Fluoreszenz wie Anthranilsäure verhielt (Abb.10). Damit war nachgewiesen, daß es sich bei dem in Anwesenheit von Glyphosat akkumulierenden Produkt um ein Intermediat des Shikimisäureweges handelte.

Durch Behandlung des in Anwesenheit von Glyphosat akkumulierenden Produktes mit alkalischer Phosphatase konnte dieses zu einer Verbindung umgesetzt werden, die in den verwendeten Systemen mit Shikimisäure, nicht aber mit 5-Enolpyruvoylshikimisäure, die bei der Phosphatasebehandlung aus EPSP entstehen würde, cochromatographierte (Abb. 10).

Eine Zusammenfassung der jeweiligen R_f-Werte in den verschiedenen Laufmitteln zeigt Tabelle 1 :

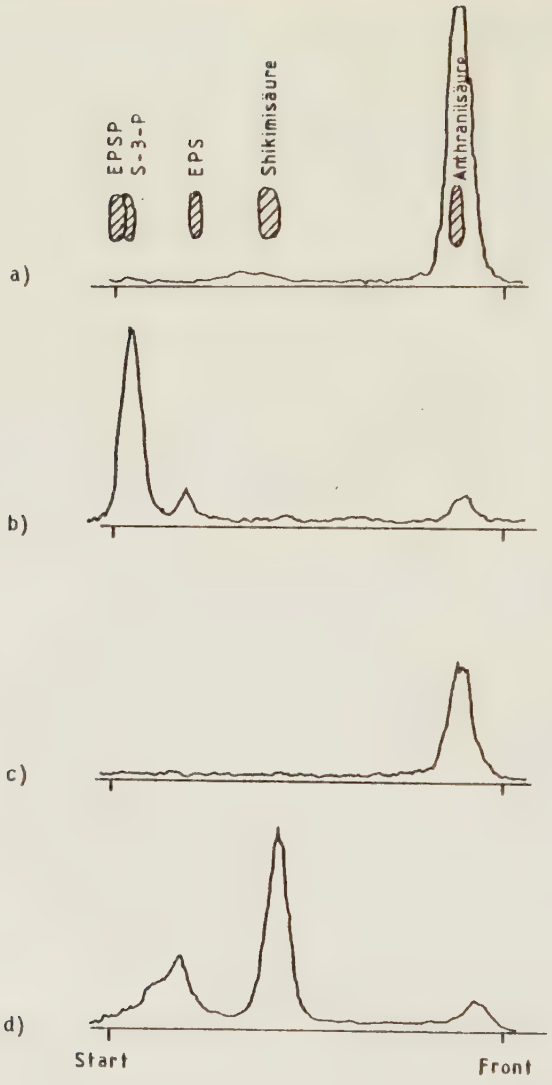


Abb. 10: Dünnschichtchromatographische Untersuchung des aus ^{14}C-markierter Shikimisäure durch einen Rohextrat aus A. aerogenes erhaltenen Produktes
a) Ansatz: Shikimisäure → Anthranilsäure
b) Ansatz a) + Glyphosat
c) Produkt aus b), nach Umsetzung in Ansatz a)
d) Produkt aus b), nach Phosphatasebehandlung

Tabelle 1 : R_f-Werte der in III.1.1.1. erhaltenen Verbindungen und der Referenzsubstanzen auf Zellulose-Dünnschichtplatten in verschiedenen Laufmitteln :

Laufmittel 1 : n-Butanol/Ethansäure/Wasser = 76/5/19
Laufmittel 2 : 2-Butanol/Methanol/Ammoniak$_{conc.}$ /Wasser = 50/35/5/10

Reaktion	R_f-Wert im Laufmittel 1	2
a) Shikimisäure → Anthranilsäure	0.86	0.67
b) Shikimisäure → Anthranilsäure,+ Glyphosat	0.05	0.02
c) Produkt aus b),nach Umsetzung in Ansatz a)	0.87	0.68
d) Produkt aus b),nach Phosphatasebehandlung	0.55	0.25
Referenzsubstanzen		
Shikimisäure	0.56	0.26
S-3-P	0.06	0.02
EPSP	0.03	0.02
Chorismsäure	0.80	0.39
Anthranilsäure	0.87	0.68
5-Enolpyruvoylshikimisäure	0.33	0.14

Es war daher anzunehmen, daß es sich bei der in Anwesenheit von Glyphosat akkumulierenden Verbindung um Shikimisäure-3-Phosphat (S-3-P)handelte. Am einfachsten ließ sich dies durch eine Hemmung des S-3-P-umsetzenden Enzyms, der EPSP-Synthase erklären; jedoch wäre auch eine Inaktivierung der nachfolgenden Enzyme nicht ausgeschlossen.

Daher erschien es notwendig, die Aktivitäten aller an der Umsetzung von Shikimisäure zu Anthranilsäure beteiligten Enzyme getrennt unter Einsatz ihrer entsprechenden Substrate in Gegenwart und Abwesenheit von Glyphosat zu messen.

1.2. Shikimat-Kinase

Die Phosphorylierung von Shikimisäure-3-Phosphat verlief unter den gewählten Bedingungen etwa 12 min mit konstanter Geschwindigkeit, danach nahm die Umsetzungsrate deutlich ab (Abb. 11).
1 mM Glyphosat hatte auf die in 10 min gebildete Menge S-3-P keinen Einfluß (Abb. 12).

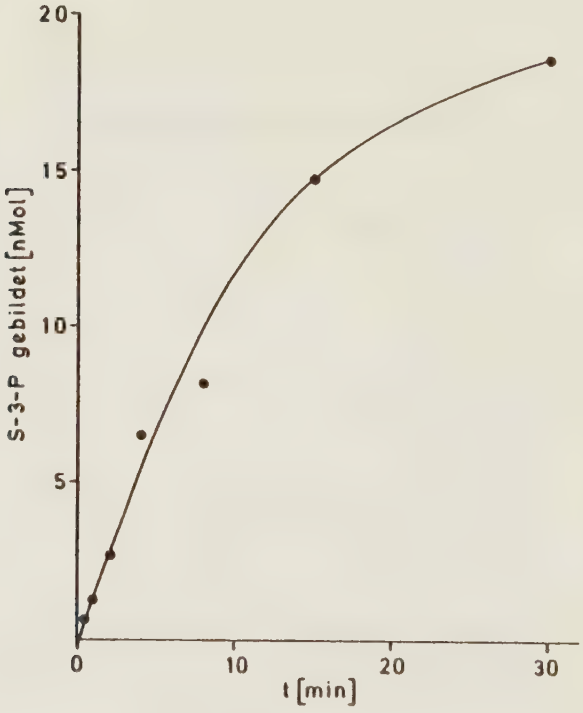


Abb. 11 : zeitlicher Verlauf der Bildung von Shikimisäure-3-Phosphat aus Shikimisäure durch Rohextrakt aus A. aerogenes 62-1

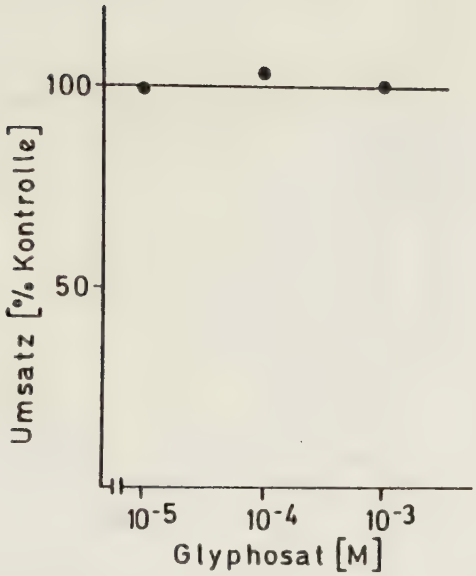


Abb. 12 : Einfluß von Glyphosat auf die Shikimat-Kinase aus Rohextrakt von A.aerogenes 62-1

1.3. Umsetzung von Shikimisäure-3-Phosphat zu Anthranilsäure

Der zeitliche Verlauf der Umsetzung von S-3-P zu Anthranilsäure ähnelte stark dem analogen Versuch mit Shikimisäure als Substrat, jedoch war die lag-Phase mit 4 min etwas kürzer, der folgende lineare Anstieg erheblich steiler. Nach etwa 50 min kam die Reaktion zum Stillstand (Abb. 13).

Die Anwesenheit von Glyphosat im Reaktionsansatz beeinflußte die in 20 min gebildete Menge Anthranilsäure drastisch: eine Herbizidkonzentration von 5µM führte zu einer Reduktion auf 50% der Kontrolle ohne Glyphosat (Abb. 14).

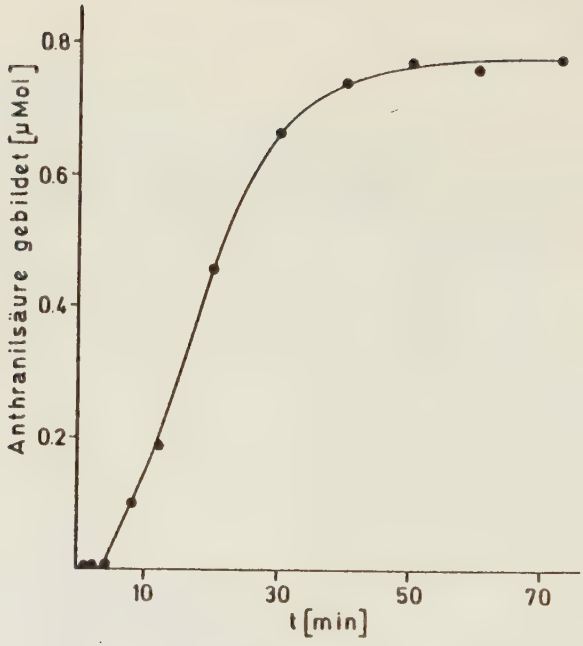


Abb. 13 : zeitlicher Verlauf der Bildung von Anthranilsäure aus S-3-P durch Rohextrakt aus A. aerogenes 62-1

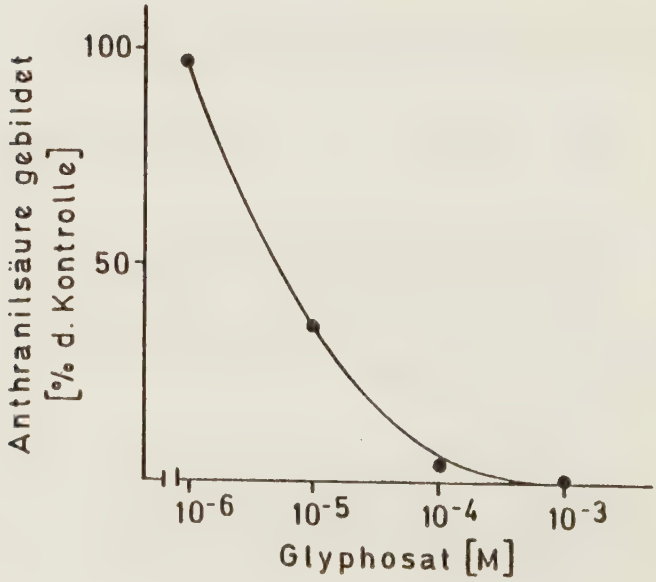


Abb. 14 : Einfluß von Glyphosat auf die Bildung von Anthranilsäure aus S-3-P durch Rohextrakt aus A. aerogenes 62-1

1.4. Anthranilat-Synthase

Unter den gewählten Bedingungen blieb die Aktivität der Anthranilat-Synthase mindestens 60 min konstant (Abb. 15). 1mM Glyphosat hatte auf die in 30 min aus Chorismsäure gebildete Menge Anthranilsäure keinen Einfluß (Abb. 16).

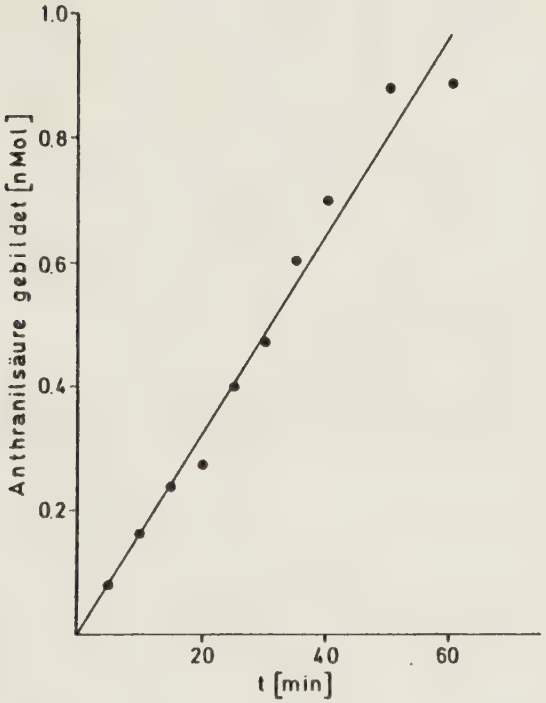


Abb. 15 : zeitlicher Verlauf der Bildung von Anthranilsäure aus Chorismsäure durch Rohextrakt aus A. aerogenes 62-1

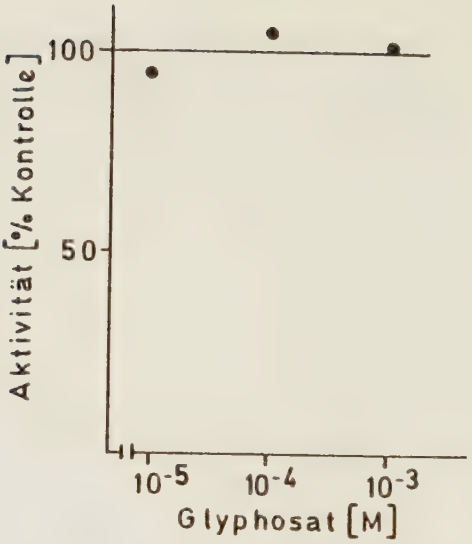


Abb. 16 : Einfluß von Glyphosat auf die Bildung von Anthranilsäure aus Chorismsäure durch Rohextrakt aus A. aerogenes 62-1

1.5. 5-Enolpyruvoylshikimisäure-3-Phosphat-Synthase

Der S-3-P-abhängige Verbrauch von PEP verlief unter den gewählten Bedingungen nur etwa 5 min linear; nach 30 min war kein weiterer Umsatz mehr festzustellen (Abb. 17). Versuche mit Rohextrakten aus E.coli ergaben bei etwas geringerer Aktivität das gleiche Bild (Abb. 17).

Glyphosat hemmte die Aktivität der EPSP-Synthase sowohl aus A. aerogenes als auch aus E.coli; Konzentrationen von 15µM reduzierten die in 5 min verbrauchte Menge PEP auf 50% der Kontrolle ohne Inhibitor (Abb. 18).

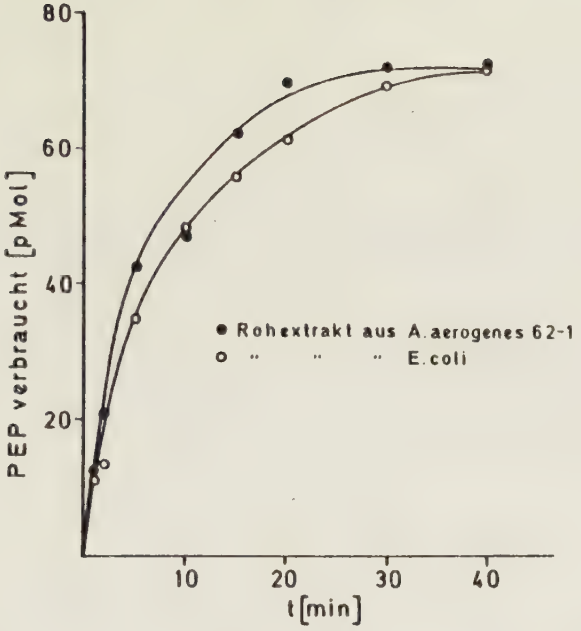


Abb. 17 : zeitlicher Verlauf des S-3-P-abhängigen PEP-Verbrauchs von Rohextrakten aus A. aerogenes 62-1 und E. coli

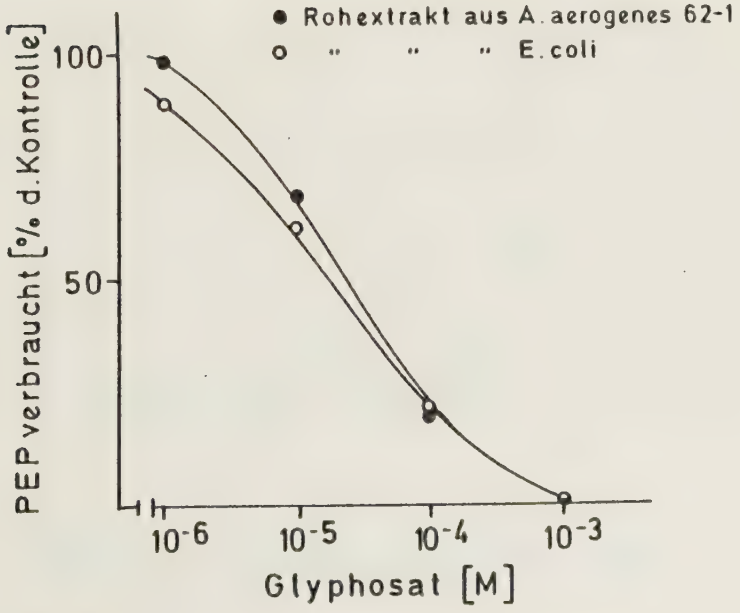


Abb. 18 : Einfluß von Glyphosat auf die EPSP-Synthase aus A. aerogenes 62-1 und E. coli

1.6. Umsetzung von 5-Enolpyruvoylshikimisäure-3-Phosphat zu Anthranilsäure

Die Bildung von Anthranilsäure aus EPSP begann nach 2 min und erfolgte dann unter den gewählten Bedingungen bis 20 min mit konstanter Geschwindigkeit. Nach 35 min war die Reaktion beendet (Abb. 19).

Glyphosat hatte auf die in 20 min gebildete Menge Anthranilsäure nahezu keinen Einfluß; lediglich in 1 mMolarer Konzentration sank sie auf 92% der Kontrolle (Abb. 20).

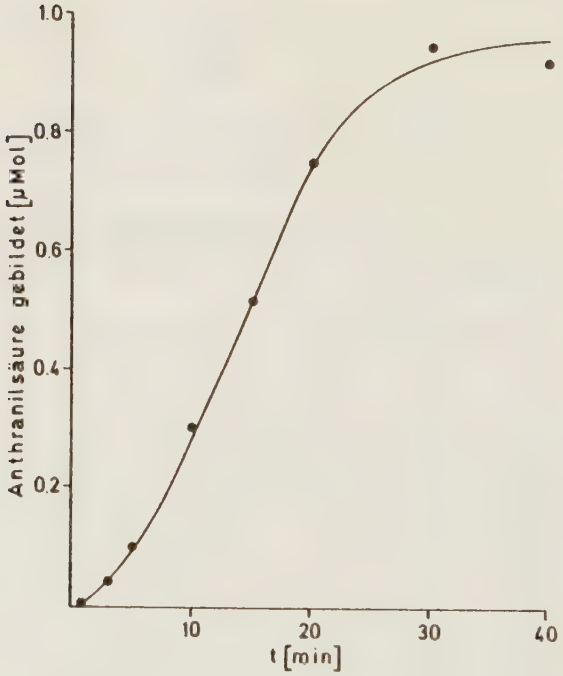


Abb. 19: zeitlicher Verlauf der Bildung von Anthranilsäure aus EPSP durch Rohextrakt aus A. aerogenes 62-1

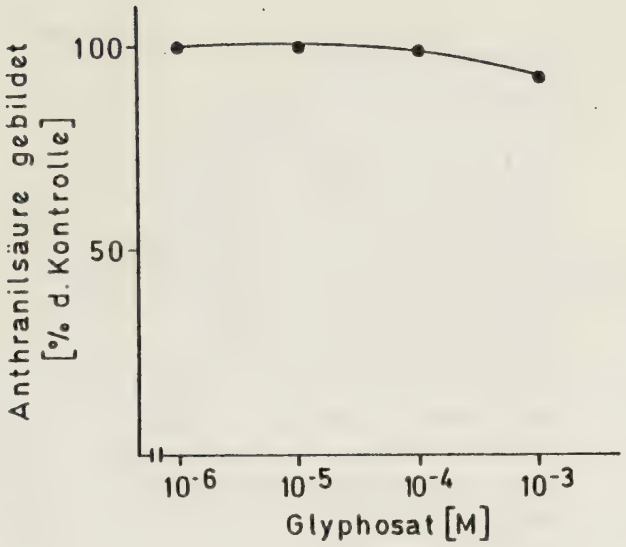


Abb. 20 : Einfluß von Glyphosat auf die Bildung von Anthranilsäure aus EPSP durch Rohextrakt aus A.aerogenes 62-1

Da Glyphosat in 1mMolarer Konzentration keinen Einfluß auf die Anthranilat-Synthase-Aktivität hatte (siehe III.1.4.) andererseits die Geschwindigkeit der Umsetzung von Chorismsäure zu Anthranilsäure bei gleichen äußeren Bedingungen wesentlich größer war als die Umsatzgeschwindigkeit von EPSP zu Anthranilsäure - die Anthranilat-Synthase die Umsetzungsgeschwindigkeit also nicht limitierte - war anzunehmen, daß die Aktivität der Chorismat-Synthase durch Glyphosat nicht gehemmt wurde.

2. Reinigung der EPSP-Synthase aus A. aerogenes 62-1

Von den vier Enzymen des Shikimisäureweges, die die Umsetzung von Shikimisäure zu Anthranilsäure in Rohextrakten aus A. aerogenes 62-1 katalysieren, wurde die EPSP-Synthase als einziges Enzym in geringen Konzentrationen durch das Herbizid Glyphosat gehemmt. Es erschien daher sinnvoll, die Herbizid-Enzym-Wechselwirkungen an einer gereinigten EPSP-Synthase näher zu untersuchen. Da jedoch ein geeignetes Reinigungsverfahren für dieses Enzym noch nicht beschrieben wurde, mußte zunächst ein eigenes Reinigungsschema entwickelt werden.

Es wurde versucht, Reinigungsschritte zu kombinieren, die zum einen auf jeweils verschiedenen Eigenschaften des Proteins beruhen, um eine möglichst weitgehende Abtrennung anderer Proteine zu ermöglichen, und die zum anderen eine möglichst hohe Stabilität des Enzyms garantieren sollten. Das Reinigungsschema umfaßt insgesamt sechs verschiedene Schritte. Eine zusammenfassende Übersicht bietet Tabelle 2. Alle angegebenen Werte wurden in einem Reinigungsverfahren ermittelt.

Da die genaue Zusammensetzung des im letzten Schritt (Chromatofokussierung) verwendeten Ampholyten ("Polybuffer") nicht genau bekannt war und da wegen dessen Verhalten als Ionenaustauscher Wechselwirkungen z.B. mit Substraten nicht ausgeschlossen schienen, wurde er über eine Sephadex G-75-Säule vom Enzym abgetrennt. Dieser Schritt wurde jedoch erst unmittelbar vor Gebrauch des Enzyms und nur mit Teilportionen durchgeführt, da die Stabilität der EPSP-Synthase in Polybuffer sehr hoch, in allen anderen untersuchten Systemen jedoch bedeutend niedriger war (siehe III.3.8.).

Tabelle 2 : Reinigungsschema der EPSP-Synthase aus A. aerogenes 62-1

Reinigungsschritt	Gesamtaktivität ukat	spez.Akt. nkat/mgProtein	Anreicherung -fach	Ausbeute %
1. Rohextrakt	1.12	0.19	--	100
2. Ammoniumsulfatfällung	1.17	0.33	1.7	105
3. Wärmefällung	1.15	0.44	2.3	103
4. DEAE-Cellulose	1.03	3.54	18.6	92
5. Sephadex G-75	0.86	58.9	310	77
6. Cellulose-Phosphat	0.73	150	790	65
7. Chromatofokussierung	0.55	630	3316	49

2.1. Ammoniumsulfatfällung

Der aus 50g tiefgefrorener Bakterien gewonnene Rohextrakt wurde einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung (40-60% Sättigung) unterworfen. Das in Puffer resuspendierte Präzipitat zeigte nach Dialyse über Nacht eine um den Faktor 1.7 erhöhte spezifische Aktivität; die Ausbeute betrug 105%.

2.2. Wärmefällung

Gegen Ende der in III.2.1. durchgeführten Dialyse wurde eine mit der Zeit zunehmende Trübung beobachtet, die sich durch eine Erwärmung des Extraktes auf 30°C erheblich verstärken ließ. Nach Abzentrifugation des Niederschlages blieb ein klarer, gelblicher Oberstand, der auch bei längerer Lagerung nicht wieder eintrübte.

Anreicherung gegenüber III.2.1.	1.3fach
Ausbeute gegenüber III.2.1.	98%

Der Rohextrakt enthielt Enzymaktivitäten, die bei pH 6.8 auch aus nur einem der beiden Substrate Phosphat freisetzten. Diese wurden durch die beiden beschriebenen Schritte nicht abgetrennt, so daß eine Aktivitätsbestimmung der EPSP-Synthase mittels Phosphattest nicht möglich war.

2.3. DEAE-Cellulose-Chromatographie

Der nach III.2.2. gewonnene Oberstand wurde über eine DEAE-Cellulose-Säule gegeben und das adsorbierte Protein mit einem linearen KCl-Gradienten eluiert.

Die Enzymaktivität wurde bei einer Leitfähigkeit von 11.2 mS (0°C) in einem einzigen Maximum vom Säulenmaterial abgelöst (Abb. 21).Alle Fraktionen mit mehr als 25% Aktivität der aktivstenFraktion wurden vereinigt.

Anreicherung gegenüber III.2.2.	8.1fach
Ausbeute gegenüber III.2.2.	89%

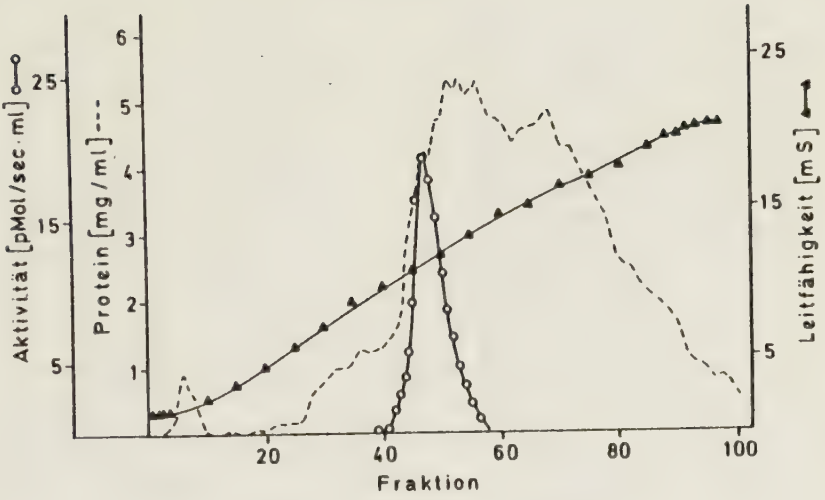


Abb. 21: Elutionsprofil der DEAE-Cellulose-Säule

Nach diesem Reinigungsschritt konnte bei pH 6.8 weder mit S-3-P noch mit PEP als jeweils alleinigem Substrat Phosphatase-Aktivität beobachtet werden.

2.4. Chromatographie an Sephadex G-75

Das nach III.2.3. erhaltene Eluat wurde durch Ammoniumsulfatfällung (0-80% Sättigung) konzentriert und über eine Sephadex G-75-Säule aufgetrennt. Es wurde wieder nur ein Aktivitätsmaximum beobachtet, das nach den beiden Hauptproteinmaxima eluierte (Abb. 22).Alle Fraktionen mit mehr als 25% der Aktivität der aktivsten Fraktion wurden vereinigt.

Anreicherung gegenüber III.2.3.	16.6fach
Ausbeute gegenüber III.2.3.	83%

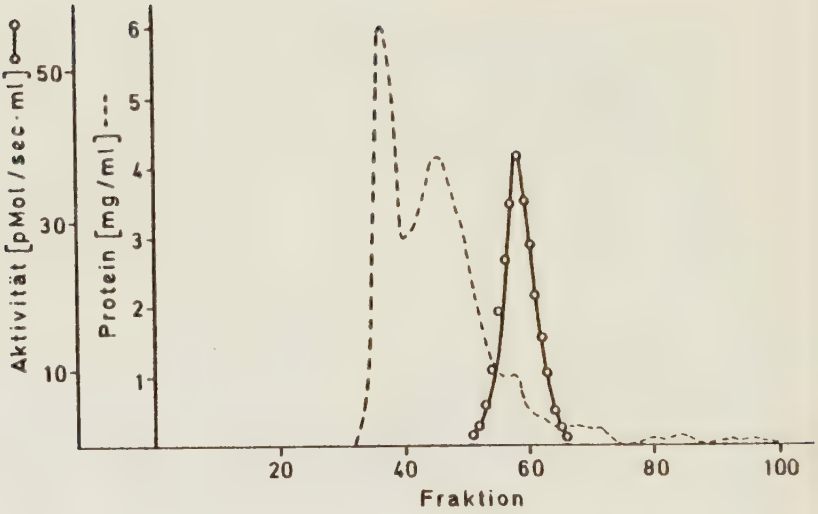


Abb. 22 : Elutionsprofil der Sephadex G-75-Säule

Bis zu dieser Reinigungsstufe war jede EPSP-Synthase-Präparation eingefroren bei -18°C mindestens 6 Monate oder bei -4°C mindestens 2 Monate ohne Aktivitätsverlust lagerbar.

2.5. Chromatographie an Cellulose-Phosphat

Das nach III.2.4. erhaltene Eluat wurde bei pH 5.9 über eine Cellulose-Phosphat-Säule gegeben, der eine kleine CM-Cellulose-Säule vorgeschaltet war. Sinn dieser Anordnung war, nur aufgrund ihrer Ladung bindende Proteine schon an die CM-Cellulose zu adsorbieren. Die EPSP-Synthase wurde ausschließlich an das Cellulose-Phosphat gebunden und von diesem mit 1 M KCl abgewaschen. Die Enzymaktivität wurde unmittelbar nach der Hauptproteinbande bei einer Leitfähigkeit von 30 mS eluiert (Abb. 23).

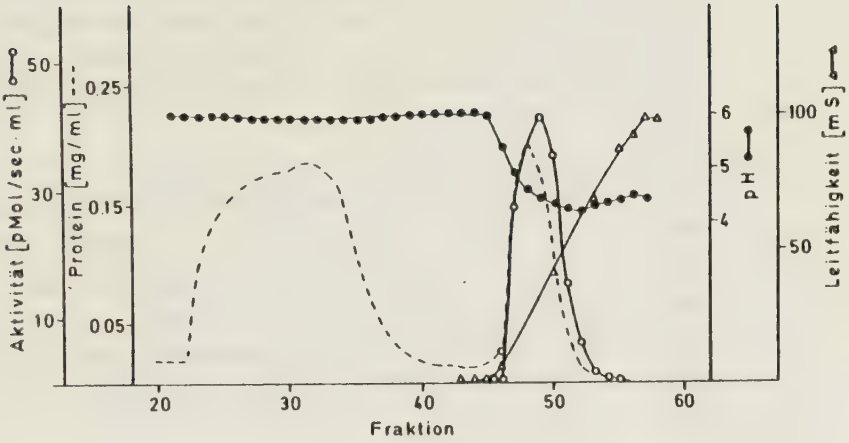


Abb. 23: Elutionsprofil der Cellulose-Phosphat-Säule

Bedingt durch einen K^+/H^+-Austausch an den Phosphatgruppen der Cellulosematrix war das KCl-Eluat stark sauer (im Aktivitätsmaximum pH 4.4). Da die EPSP-Synthase bei diesen pH-Werten sehr instabil ist (siehe III.3.8.), mußte die Elution sehr rasch erfolgen. Aus diesem Grunde schien auch eine Ablösung des Enzyms durch einen KCl-Gradienten anstelle der verwendeten 1M KCl-Lösung, die wahrscheinlich eine bessere Auflösung zur Folge hätte, nicht ratsam.
Ein sehr steiler Salz-Gradient hatte sich durch den K^+/H^+-Austausch an dem Ionenaustauscher von selbst ausgebildet.

Anreicherung gegenüber III.2.4.	2.5fach
Ausbeute gegenüber III.2.4.	85.2%

Nach diesem Schritt war ein Einfrieren des Enzyms mit einem vollständigen Aktivitätsverlust verbunden.

2.6. Chromatofokussierung

Die Chromatofokussierung ist ein relativ neues Verfahren, durch das bei hoher Auflösung Proteine aufgrund ihrer iso-

elektrischen Punkte aufgetrennt werden. Gegenüber der isoelektrischen Fokussierung besteht der Vorteil, daß sie mit erheblich geringerem Zeitaufwand durchgeführt werden kann, was besonders bei Proteinen, die an ihrem isoelektrischen Punkt instabil sind, zu erheblich höheren Aktivitätsausbeuten führt.

Die nach III.2.5. gewonnene Enzymlösung wurde bei pH 6.8 an den Ionenaustauscher adsorbiert und die Säule anschließend mit dem auf pH 4.0 eingestellten Polybuffer gespült.

Das Elutionsprofil zeigte einen fast linearen pH-Abfall von pH 6.8 bis 4.0. Die EPSP-Synthase wurde synchron mit einem Proteinmaximum bei pH 4.6 von dem Ionenaustauscher abgelöst (Abb. 24).

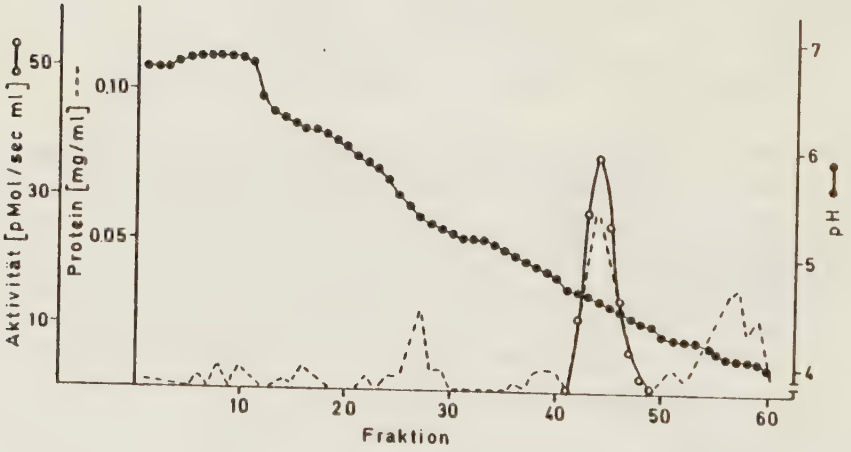


Abb. 24 : Elutionsprofil der Chromatofokussierung

Anreicherung gegenüber III.2.5.	4.2fach
Ausbeute gegenüber III.2.5.	75%

Nach Restjustierung des pH-Wertes im Eluat auf 6.8 war die EPSP-Synthase in Polybuffer, dem 1mM DTE zugesetzt wurde, sehr stabil. Bei 0-4°C konnte in 2 Monaten, im Tiefkühlschrank bei -18°C in 9 Monaten kein Aktivitätsverlust festgestellt werden.

2.7. Elektrophoretische Untersuchung der gereinigten EPSP-Synthase

2.7.1. Elektrophorese unter nicht denaturierenden Bedingungen

Nach elektrophoretischer Auftrennung der in III.2.6. erhaltenen EPSP-Synthase-Präparation unter nicht denaturierenden Bedingungen und nachfolgender Anfärbung des Gels mit Serva Blau G zeigte sich eine Haupt- und eine sehr schwache Nebenbande. Die Farbstoffverteilung wurde zu 99% in der Haupt- und zu 1.2% in der Nebenbande lokalisiert (Abb. 25).

Zwei parallele Bahnen eines nicht angefärbten Abschnittes des Gels wurden jeweils in 1mm breite Stückchen geschnitten, die Gelstückchen über Nacht bei +4°C in 0.2 ml 20 mM Hepes/NaOH, 1 mM EDTA, 1 mM DTE pH 6.8 geschüttelt und anschließend die EPSP-Synthase-Aktivität im Puffer bestimmt. Abb.25 zeigt ein einziges Aktivitätsmaximum, das auf gleicher Höhe liegt wie die Hauptfarbbande.

2.7.2. Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen

Elektrophoretische Auftrennung der nach III.2.6. erhaltenen EPSP-Synthase-Präparation in Anwesenheit von SDS führte ebenfalls zu zwei mit Serva Blau G anfärbbaren Banden (Abb. 26). Die Hauptbande enthielt 99.2%, die Nebenbande 0.8% des gebundenen Farbstoffs.

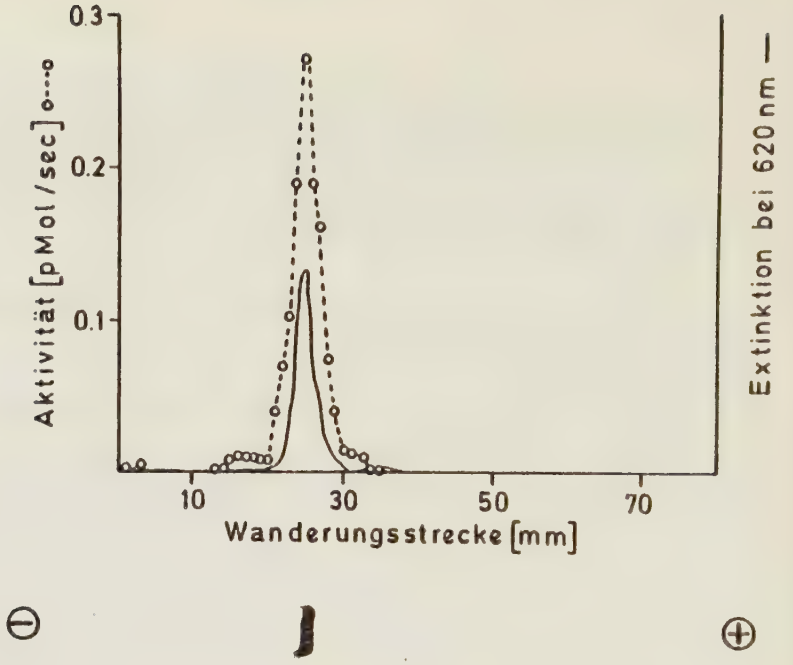


Abb. 25: Polyacrylamidgel-Elektrophorese der gereinigten EPSP-Synthase aus A. aerogenes 62-1 unter nicht denaturierenden Bedingungen

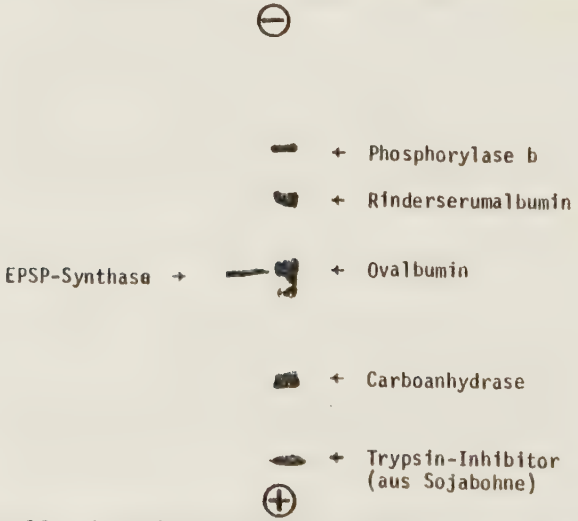


Abb. 26: SDS-Polyacrylamidgel- Elektrophorese der gereinigten EPSP-Synthase aus A. aerogenes 62-1

2.8 Abtrennung des Polybuffers

Die Abtrennung des im letzten Reinigungsschritt (III.2.6.) verwendeten Polybuffers vom Enzym erfolgte mit einer Sephadex G-75-Säule. Da der Ampholyt im kurzwelligen UV-Licht stark absorbiert, ließ sich durch die Messung der Extinktion bei 240 nm feststellen, ob eine quantitative Abtrennung erfogt war. Das Elutionsprofil (Abb. 27) zeigte eine vollständige Trennung der Enzymaktivität von dem bei 240 nm absorbierenden Material. Ausbeute und spezifische Aktivität änderten sich in gleichem Maße und betrugen etwa 80% des Ausgangswertes.

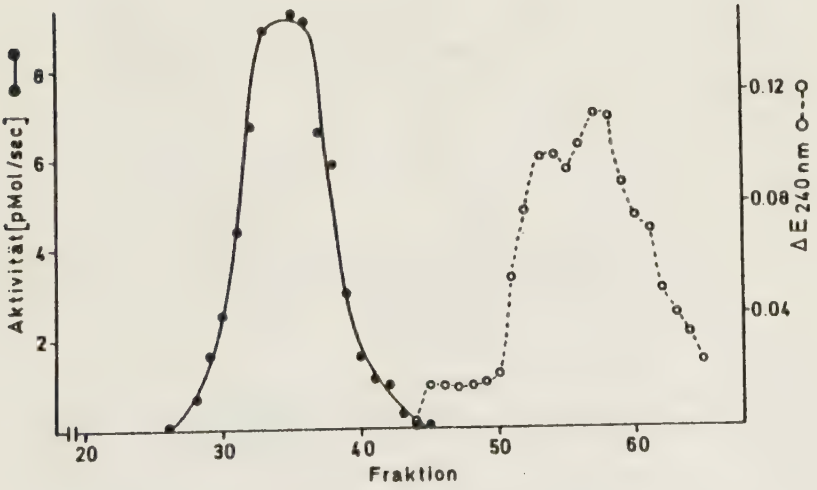


Abb. 27: Elutionsprofil der Sephadex G-75-Säule II (Abtrennung des Polybuffers)

3. Eigenschaften der EPSP-Synthase aus A. aerogenes 62-1

3.1. Abhängigkeit der Produktbildung von der Zeit

3.1.1. Hinreaktion

Bei Substratüberschuß war die Menge des gebildeten Produktes mindestens 100 min proportional zur Reaktionszeit. Abweichungen von der Linearität konnten, wenn beide Substrate in gleicher Konzentration eingesetzt wurden, nach einem Umsatz von etwa 40% der Substratmenge beobachtet werden (Abb. 28).

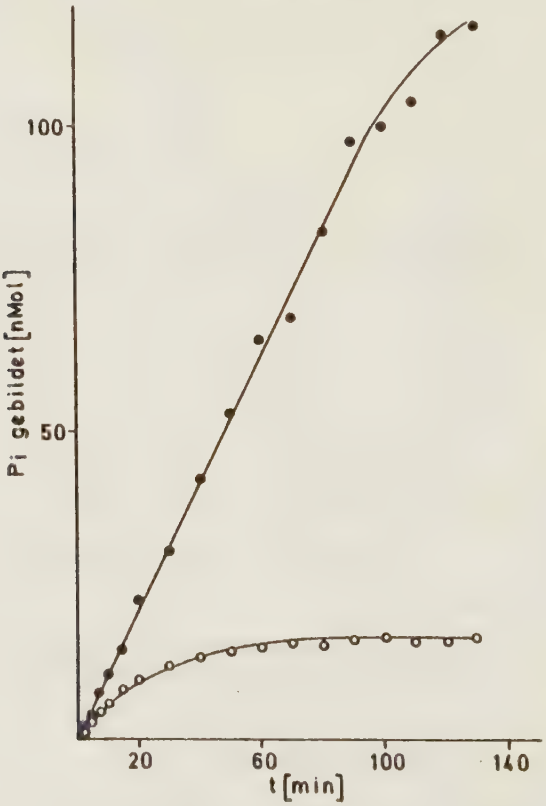


Abb. 28 : Abhängigkeit der Produktbildung von der Zeit (Hinreaktion) bei verschiedenen Substratkonzentrationen

• beide Substrate jeweils 2.5 mM
o beide Substrate jeweils 0.25 mM

3.1.2. Rückreaktion

Die Bildung von PEP aus EPSP und P_i war unter den gegebenen Bedingungen, d.h. Oberschuß an Substraten und Hilfssubstraten für die nachgeschalteten enzymatischen Reaktionen, mindestens 40 min linear mit der Zeit (Abb. 29).

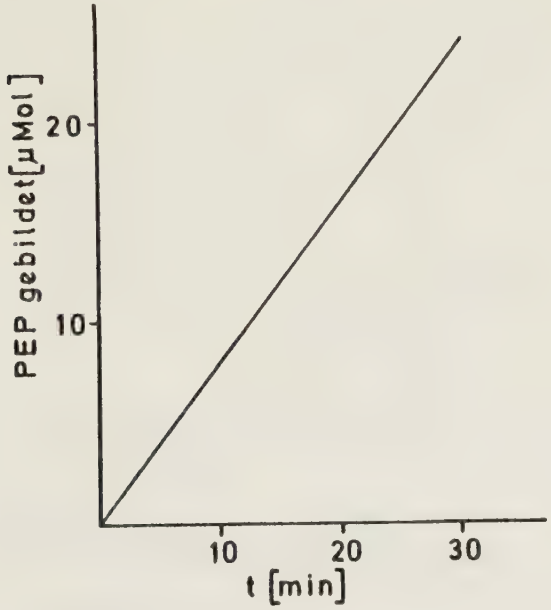


Abb. 29 : Abhängigkeit der Produktbildung von der Zeit (Rückreaktion)

3.2. Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Proteinmenge

3.2.1. Hinreaktion

Bis mindestens 20 µM/sec·Ansatz entsprechend 33 pg Protein/Ansatz nahm unter den gegebenen Bedingungen die Geschwindigkeit der Produktbildung linear mit der Enzymmenge zu (Abb. 30).

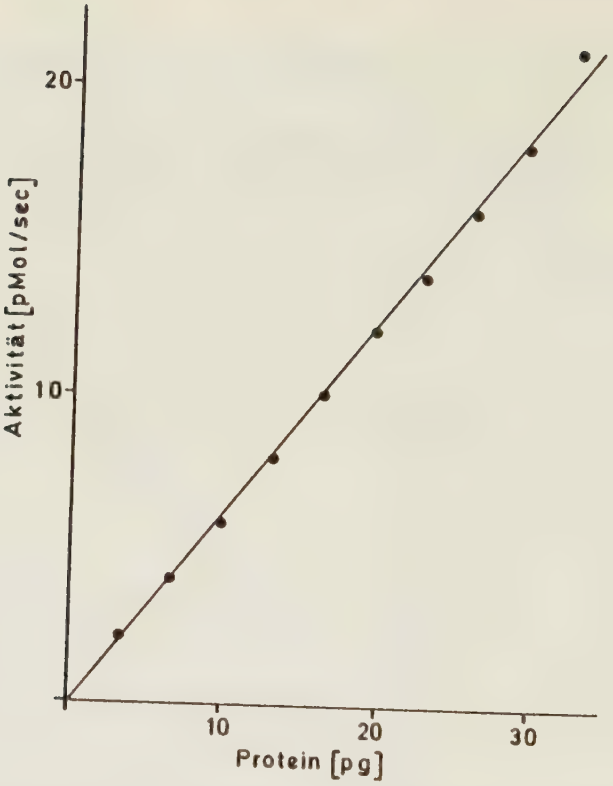


Abb. 30: Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Proteinmenge (Hinreaktion)

3.2.2. Rückreaktion

Die Reaktionsgeschwindigkeit war unter den gewählten Bedingungen bis mindestens 28 pMol/sec·Ansatz entsprechend 0.35 µg Protein/Ansatz proportional der eingesetzen Enzymmenge (Abb. 31).

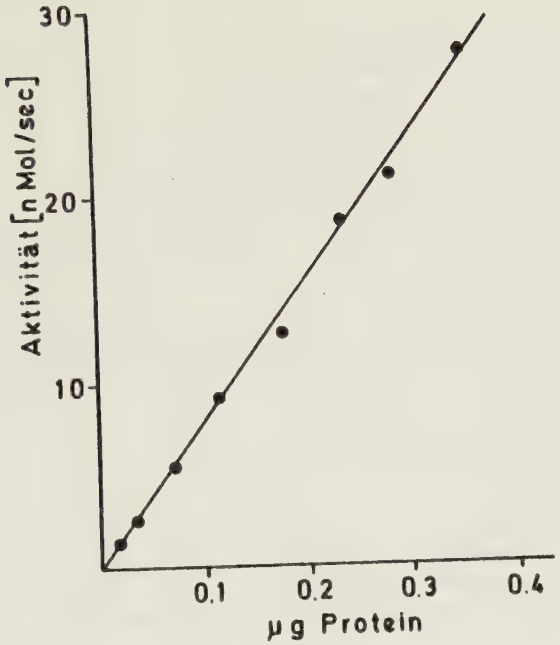


Abb. 31 : Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Proteinmenge (Rückreaktion)

3.3. Bestimmung des Molekulargewichtes

3.3.1. Ausschlußchromatographie an Sephadex G-100 Superfine

Nach Auftrennung eines EPSP-Synthase/Eichprotein-Gemisches über eine Sephadex G-100 Superfine-Säule ergab sich eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichtes der Eichproteine und dem Elutionsvolumen (Abb. 32). Aus der Regressionsgeraden wurde das Molekulargewicht der EPSP-Synthase mit 32,400 D ermittelt. Ein identischer Wert wurde in einem zweiten unabhängigen Versuch erhalten.

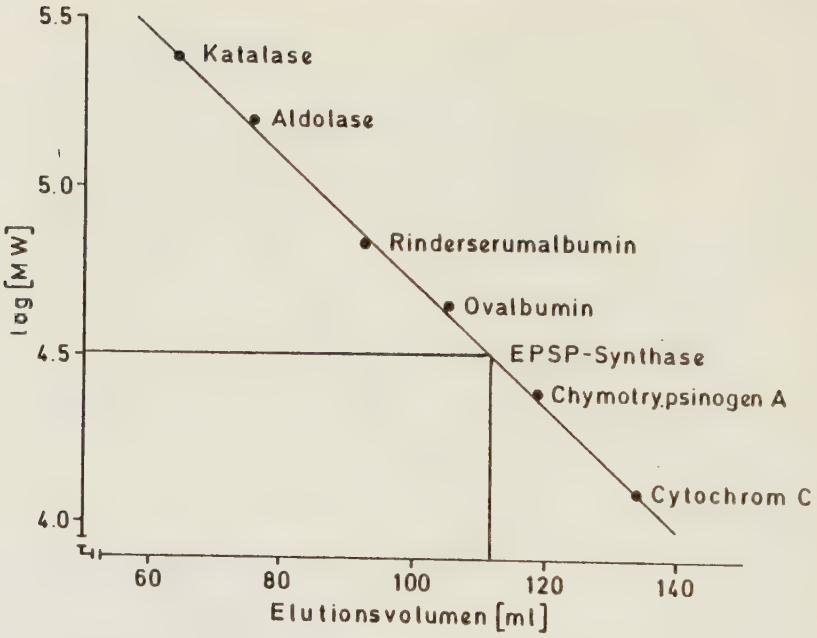


Abb. 32 : Bestimmung des Molekulargewichtes der EPSP-Synthase durch Gel-Chromatographie

3.3.2. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Elektrophorese in SDS-Polyacrylamidgel (linearer Polyacrylamidgradient 10-15%) ergab für Proteine mit kleinerem Molekulargewicht als 45,000 D eine lineare Beziehung zwischen dem Molekulargewicht und dem R_f-Wert (Abb. 33).

Das Molekulargewicht der EPSP-Synthase aus A. aerogenes 62-1 wurde in sechs unabhängigen Versuchen mit 42,900 D ± 700 D bestimmt.

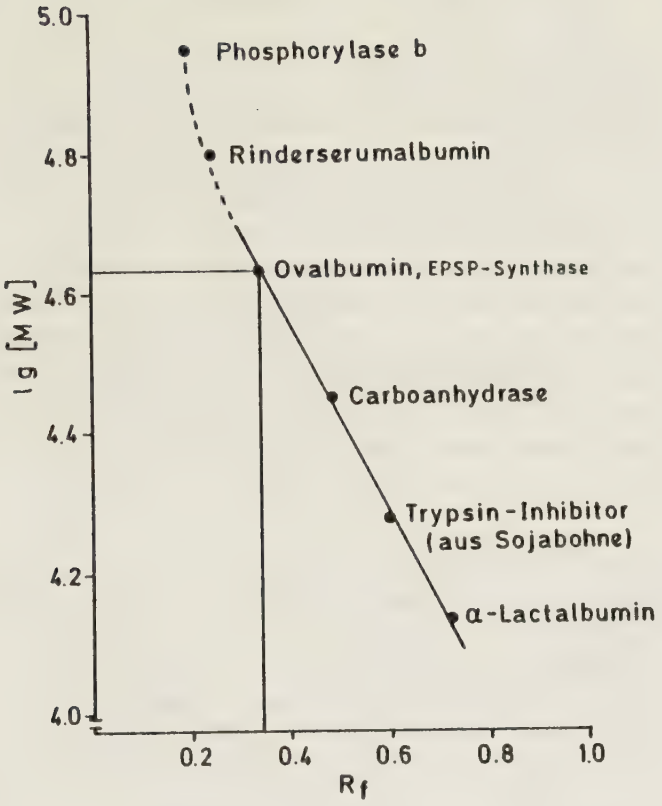


Abb. 33: Bestimmung des Molekulargewichtes der EPSP-Synthase durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

3.4. Bestimmung des Isoelektrischen Punktes

Zur Bestimmung des Isoelektischen Punktes(IEP) wurde die EPSP-Synthase-Präparation der isoelektrischen Fokussierung in Polyacrylamidgel-Fertigplatten unterworfen. Nach Beendigung des Vorgangs wurden die einzelnen Spuren ausgeschnitten und in 1 mm breite Stückchen zerteilt. Nach Zugabe von je 0.1 ml 20 mM Hepes/NaOH-Puffer pH 6.8, der 1 mM EDTA und 1 mM DTE enthielt, wurden die einzelnen

Stückchen über Nacht bei 4°C unter häufigem Umschütteln gelagert und anschließend die Enzymaktivität im Puffer bestimmt.

Aus parallelen Spuren wie oben beschrieben erhaltene Gelstückchen wurden mit je 0.1 ml frisch ausgekochtem H_2O bidest versetzt und die Gefäße sofort verschlossen. Nach 4 h Schütteln bei Raumtemperatur wurde der pH-Wert gemessen.

Eine weitere Spur wurde mit Serva Blau G angefärbt. Wie in Abb.34 dargestellt, ergab sich ein einziges Aktivitätsmaximum bei pH 4.6, das auf gleicher Höhe mit dem Proteinmaximum lag. Der so ermittelte IEP ist identisch mit dem durch Chromatofokussierung erhaltenen Wert (siehe III.2.6.)

Die zusätzliche Bande bei pH 7 wurde auch in Kontrollversuchen ohne EPSP-Synthase erhalten.

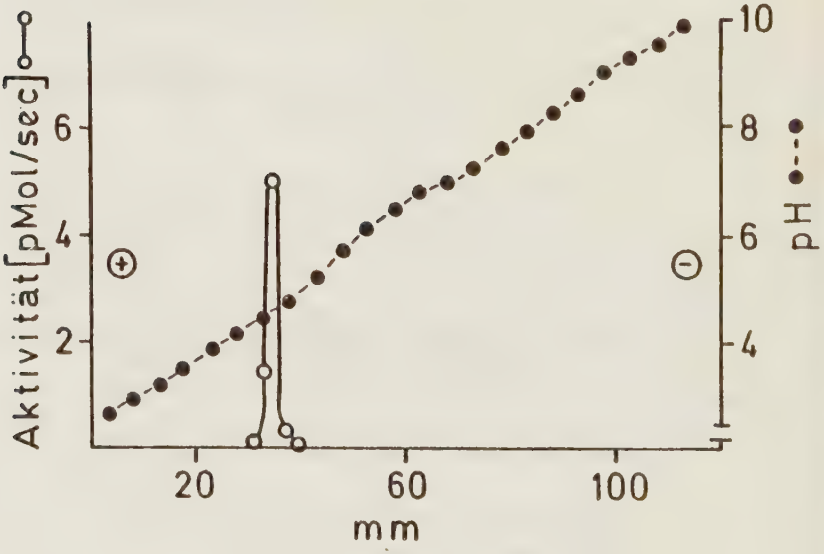


Abb. 34 : Isoelektrische Fokussierung der gereinigten EPSP-Synthase aus A. aerogenes 62-1

3.5. Bestimmung des pH-Optimums

Reaktionsgeschwindigkeiten enzymatisch katalysierter Reaktionen werden im allgemeinen stark vom pH-Wert des Reaktionsmediums beeinflußt, da Änderungen des pH-Wertes Änderungen des Ionisationsgrades der bei der Ausbildung des Enzym-Substrat-Komplexes beteiligten geladenen Gruppen sowohl der Aminosäurereste des Enzyms als auch der Substrate zur Folge haben können. Darüber hinaus ist auch eine irreversible Denaturierung des Enzyms möglich.

Der Einfluß des pH-Wertes auf die Aktivität der EPSP-Synthase wurde mit verschiedenen Puffersystemen untersucht, da einerseits keiner der verwendeten Puffer den gesamten pH-Bereich abdeckte, andererseits auch ein Einfluß der Natur der Pufferionen auf die Enzymaktivität nicht ausgeschlossen schien.

Alle angegebenen Enzymaktivitäten wurden in der linearen Anfangsphase der Reaktion ermittelt, so daß eine pH-abhängige Denaturierung der EPSP-Synthase auszuschließen war. Die Messung des pH-Wertes erfolgte mit einer pH-Mikroelektrode direkt in einem jeweils entsprechenden Parallelansatz.

3.5.1. Hinreaktion

Das pH-Profil der Hinreaktion zeigte zwei Aktivitätsmaxima bei pH 5.4 und pH 6.8 mit einem dazwischen liegenden leichten Sattel (pH6.0). Während im sauren Bereich ein sehr steiler Aktivitätsabfall zu beobachten war (Wendepunkt bei pH 5.1), nahm die Reaktionsgeschwindigkeit im alkalischen Bereich langsam ab (Wendepunkt pH 8.1) (Abb. 35).

Die Art des verwendeten Puffers war nicht ohne Einfluß auf die Enzymaktivität. Im Bereich der Maxima war die Aktivität der EPSP-Synthase in Hepes/NaOH größer als in Tris/Maleinsäure/NaOH, und in diesem wiederum größer als in Citronensäure/NaOH; jedoch verschwand der Unterschied in den

Flankenbereichen. Mit jeweils nur einem der beiden Substrate konnte über den gesamten pH-Bereich keine Phosphatfreisetzung beobachtet werden.

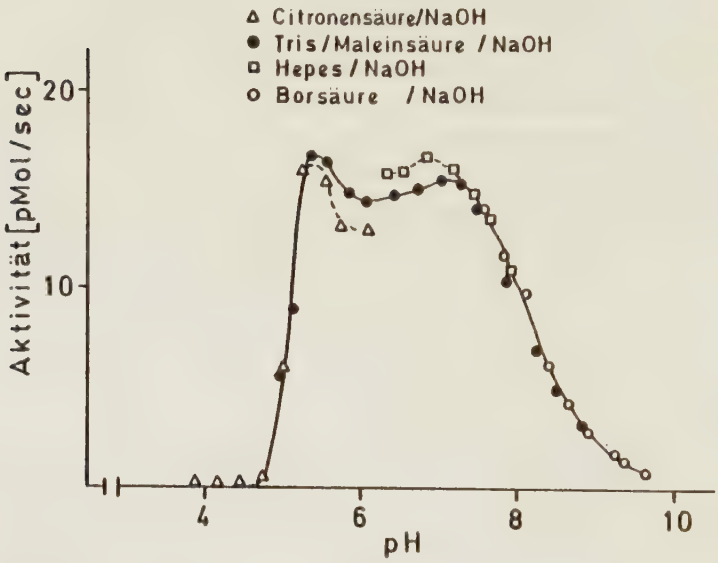


Abb. 35 : Abhängigkeit der EPSP-Synthase-Aktivität vom pH-Wert in verschiedenen Puffersystemen (Hinreaktion)

3.5.2. Rückreaktion

Die pH-Abhängigkeit der Rückreaktion war ebenfalls durch einen zweigipfligen Kurvenverlauf gekennzeichnet; jedoch war das bei pH 7.6 gelegene Maximum erheblich höher als das bei pH 5.6 gelegene. Beide waren gegenüber der Hinreaktion zu höheren pH-Werten verschoben (Abb. 36).

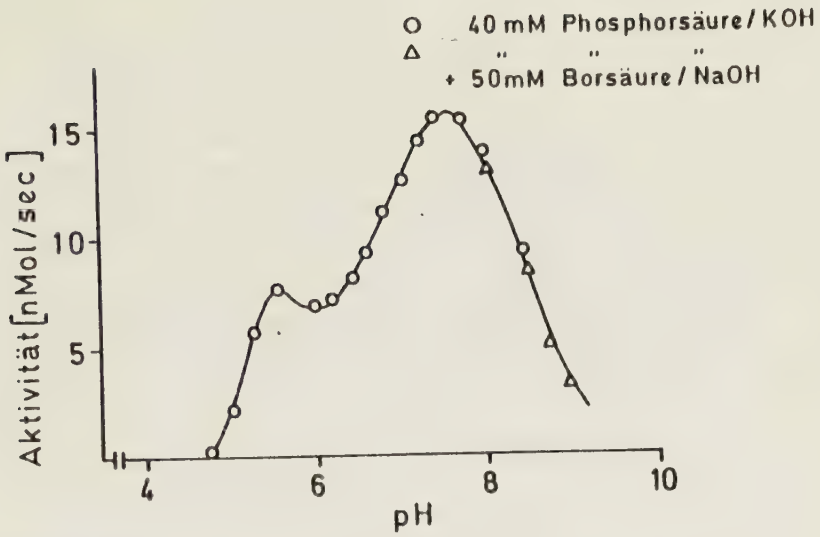


Abb. 36 : Abhängigkeit der EPSP-Synthase-Aktivität vom pH-Wert in verschiedenen Puffersystemen (Rückreaktion)

3.6. Bestimmung des Temperaturoptimums

Die Geschwindigkeit chemischer Reaktionen nimmt im allgemeinen mit der Temperatur zu. Für enzymkatalysierte Reaktionen gilt dies aber nur mit Einschränkungen, da Enzyme in der Regel nicht über beliebige Temperaturbereiche stabil sind und nach ihrer Denaturierung die Reaktionsgeschwindigkeit meistens sehr viel geringer wird.

Die EPSP-Synthase wies bereits bei $0^{o}C$ eine geringere Aktivität auf. Bis ca. $60^{o}C$ nahm die Enzymaktivität dann drastisch zu, um bei höheren Temperaturen wieder abzufallen (Abb. 37). Bei Temperaturen über $60^{o}C$ war es jedoch nicht möglich, lineare Produkt/Zeit-Abhängigkeiten zu erhalten, da das Enzym zu schnell inaktiviert wurde. Es ist daher sinnvoller, nicht von einem Temperaturoptimum, sondern einem Temperaturmaximum zu sprechen.

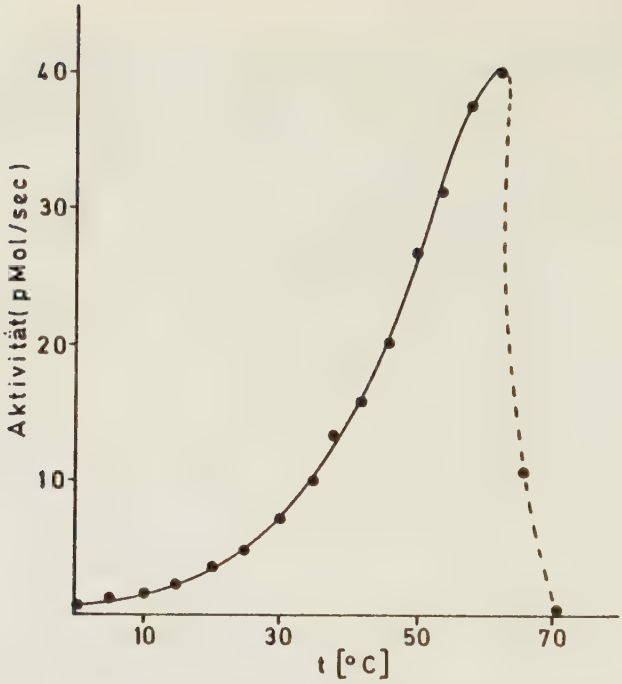


Abb. 37 : Abhängigkeit der EPSP-Synthase-Aktivität von der Temperatur (Hinreaktion)

3.7. Abschätzung der Aktivierungsenergie

Arrhenius formulierte 1889 folgenden Zusammenhang zwischen der Aktivierungsenergie E_a und der Geschwindigkeitskonstanten einer Reaktion k :

$$\frac{d\ln(k)}{dT} = \frac{E_a}{RT^2}$$

wobei T die absolute Temperatur und R die Gaskonstante darstellt (DAWES, 1980). Durch Integration erhält man eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der Geschwindigkeitskonstanten und dem Kehrwert der Temperatur :

$$\ln(k) = -\frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T} + \text{const.}$$

Unter sättigender Substratkonzentration ist es möglich, k durch die gemessene Reaktionsgeschwindigkeit v anzunähern. Nach Auftragung von ln(k) gegen $\frac{1}{T}$ läßt sich aus der Steigung der Geraden E_a berechnen.

Aus den Arrhenius-Plots der Hin- und Rückreaktion (Abb. 38) wurde die Aktivierungsenergie für die Hinreaktion mit 54.2 kJ/Mol und für die Rückreaktion mit 64.1 kJ/Mol bestimmt.

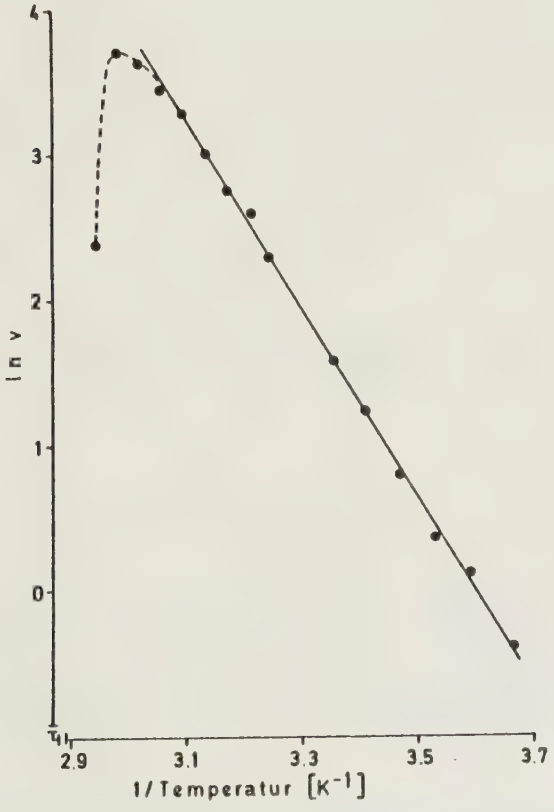


Abb. 38: Arrhenius-Diagramm der Abhängigkeit der EPSP-Synthase-Aktivität von der Temperatur
a) Hinreaktion

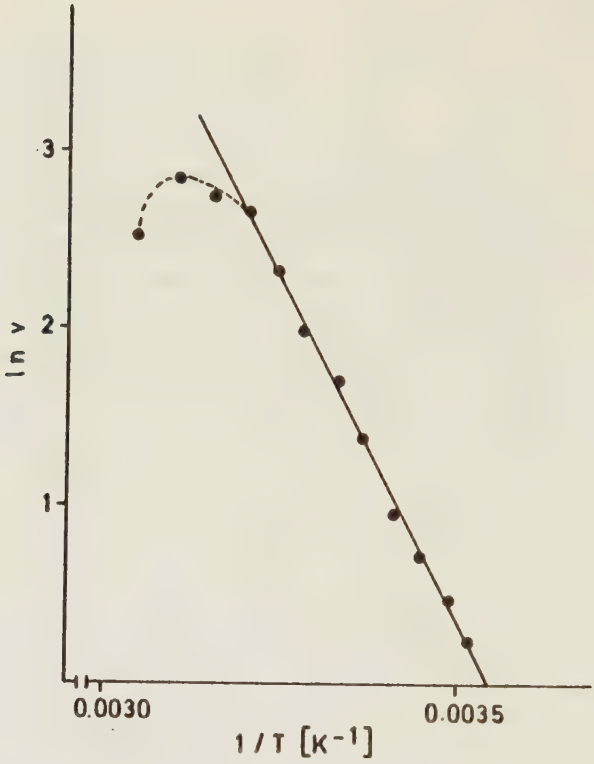


Abb. 38: Arrhenius-Diagramm der Abhängigkeit der EPSP-Synthase-Aktivität von der Temperatur
b) Rückreaktion

3.8. Versuche zur Stabilität der EPSP-Synthase

In hochgereinigtem Zustand war die EPSP-Synthase in Abwesenheit von EDTA und DTE so instabil, daß eine Handhabung nicht möglich war. In allen folgenden Versuchen wurden daher beide Verbindungen in jeweils 1 mM Konzentration eingesetzt.

3.8.1. Einfluß des pH-Wertes

Nach der Zugabe des jeweiligen Puffers (Endkonzentration 50 mM) wurde die Enzymlösung bei 30°C aufbewahrt und zu den angegebenen Zeiten die Aktivität bei pH 6.8 bestimmt. Der pH-Wert wurde direkt in der Enzymlösung gemessen.

Wie in Abb.39 dargestellt, hing die Stabilität des Enzyms unter den gegebenen Bedingungen sowohl vom pH-Wert der Lösung als auch von der Art des eingesetzten Puffers ab.

Bei pH-Werten < 6.5 war - unabhängig vom verwendeten Puffersystem - schon nach 3 h keine Aktivität mehr festzustellen. Zwischen pH 6.5 und 8.5 stieg die Stabilität in Tris/Maleinsäure/NaOH mit dem pH-Wert, jedoch war auch bei pH 8.5 nach 22 h weniger als 5% Restaktivität vorhanden. In Borsäure/NaOH dagegen war zwischen pH 7.4 und 8.5 auch nach 22 h kein Aktivitätsabfall festzustellen, bei höheren pH-Werten nahm die Stabilität deutlich ab.

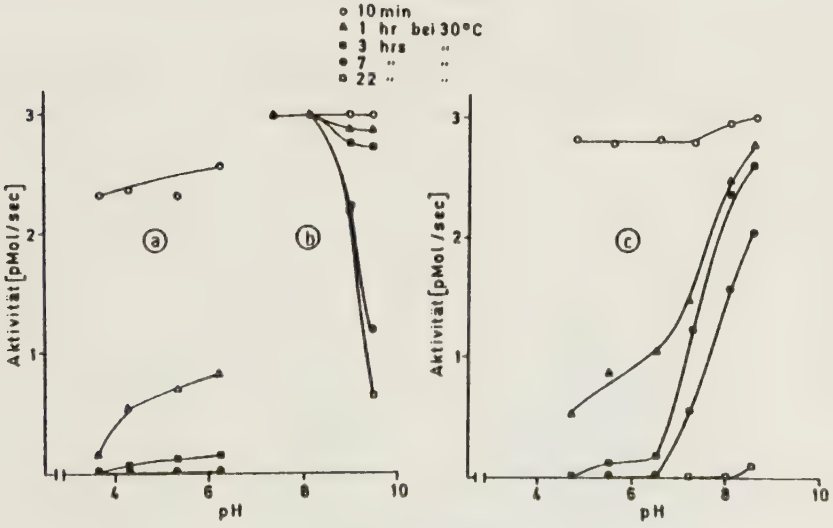


Abb. 39: Einfluß des pH-Wertes auf die Stabilität der EPSP-Synthase in unterschiedlichen Puffersystemen

a) Citronensäure/NaOH-Puffer
b) Borsäure/NaOH-Puffer
c) Tris/Maleinsäure/NaOH-Puffer

Im allgemeinen schien die EPSP-Synthase in sauren und stark alkalischen pH-Bereichen nicht stabil zu sein, wohingegen zwischen pH 7.0 und 8.5 ein Bereich relativer - d.h. Puffer-abhängiger - Stabilität bestand.

3.8.2.Einfluß von Puffersystemen bei pH 6.8

Da die Stabilität der EPSP-Synthase wesentlich vom verwendeten Puffersystem abhing, und es andererseits bequem erschien, das Enzym bei pH 6.8 aufzubewahren, weil bei diesem pH-Wert die Messungen durchgeführt wurden, wurde versucht, ein Puffersystem zu finden, das auch bei pH 6.8 optimale Stabilität gewährleistete.

Nach Zugabe des jeweiligen Puffers wurde bei 4°C inkubiert und nach 1 h und nach 17 h die Aktivität bestimmt. Alle Ansätze enthielten 5 mM Imidazol/HCl, da das Enzym sich vor der Zugabe des jeweiligen Puffers in Imidazol/HCl befunden hatte. Das Ergebnis zeigt Tabelle 3.

Tabelle 3: Stabilität der EPSP-Synthase in verschiedenen Puffersystemen bei pH 6.8

Puffer		Aktivität in % der Ausgangs-Aktivität nach	
		1 h	17 h
Kontrolle		98	91
Hepes/NaOH	100 mM	101	93
Mes/NaOH	100 mM	31	13
Pipes/NaOH	100 mM	83	79
Imidazol/HCl	100 mM	35	27
Aces/NaOH	100 mM	50	42
Tris/Maleinsäure/NaOH	100 mM	94	77

Obwohl die Kontrolle (5 mM Imidazol/HCl) über den untersuchten Zeitraum stabil war, führte eine Erhöhung der Imidazol/HCl-Konzentration zu einer beträchtlichen Abnahme der Aktivität.

Der einzige Puffer, der auch in 100 mMolarer Konzentration innerhalb von 17 h weniger als 10% Aktivitätsverlust zur Folge hatte, war Hepes/NaOH, relativ gut stabilisierte noch Tris/Maleinsäure/NaOH.

In Polybuffer (1:8 verdünnt) konnte - auch in Abwesenheit von EDTA - innerhalb von 2 Monaten kein Aktivitätsverlust festgestellt werden.

Das Enzym wurde daher solange als möglich in Polybuffer aufbewahrt, nach dessen Abtrennung wurde es dann in Hepes/NaOH gelagert.

3.8.3. Einfluß verschiedener Reagenzien

Nach Zugabe der betreffenden Verbindung wurde bei 30°C inkubiert und zu den angegebenen Zeiten die Aktivität bestimmt. Alle Ansätze enthielten 20 mM Hepes/NaOH, 1 mM EDTA,pH 6.8 und 1 mM DTE.

a. Mit SH- oder S-S-Gruppen reagierende Verbindungen

Es wurden eine Reihe von Reagenzien untersucht, die mit SH- oder S-S-Gruppen reagieren können. Das Ergebnis ist komplex und nicht einfach zu interpretieren (Abb. 40).

Die Kontrolle war kurzfristig stabil (3 h), verlor aber über lange Zeit (48 h) stark an Aktivität. Weitere Zugabe von DTE oder Dithiothreit (DTT) bewirkte für kurze Zeit eine Aktivierung, nach 48 h lag die Aktivität jedoch deutlich unter der der Kontrolle. Ähnlich wirkte Ascorbat. 2-Mercaptoethanol (ME) oder Thioglycolsäure erhielten die Enzymaktivität über den gesamten Beobachtungszeitraum, ohne aktivierend zu wirken. Cystein jedoch erhöhte die Aktivität innerhalb einer Stunde um 28%, danach blieb diese 48 h unverändert. Jodacetamid und H_2O_2 führten

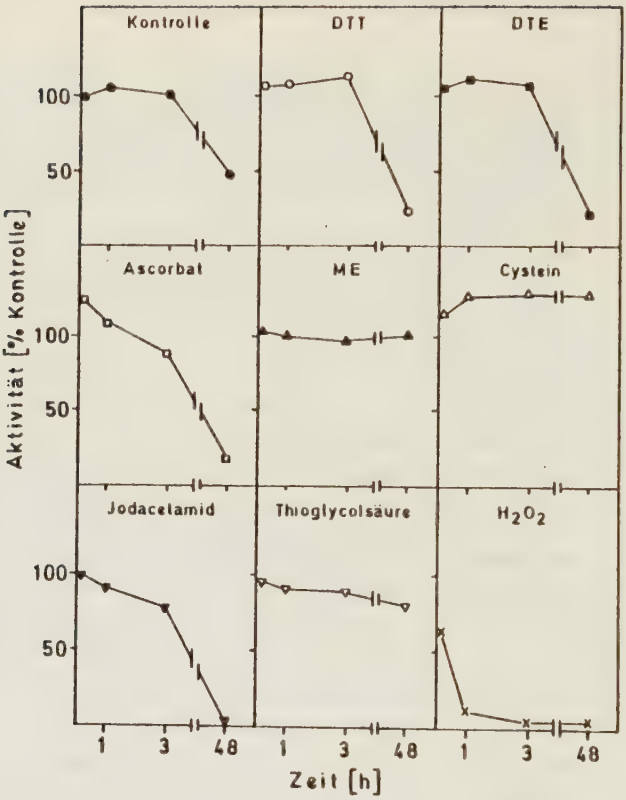


Abb. 40 : Abhängigkeit der Stabilität der EPSP-Synthase von der Anwesenheit mit SH- oder S-S-Gruppen reagierender Verbindungen . (alle Verbindungen 5 mM)

zu einem mehr oder weniger schnellen quantitativen Aktivitätsverlust. Zugabe von p-Chloromercuribenzolsulfonsäure (p-CMBS) bewirkte innerhalb von 3 min einen vollständigen Verlust der Enzymaktivität (ohne Abb.).

Die Stabilität der EPSP-Synthase schien stark vom Redoxpotential der Lösung abhängig zu sein. Starke Reduktionsmittel (DTE, DTT, Ascorbat) wirkten kurzfristig aktivierend, langfristig jedoch inaktivierend. Es schien daher im Enzym einerseits Gruppen zu geben, die reduziert sein müssen, um die katalytische Aktivität des Enzyms zu gewährleisten, beispielsweise SH-Gruppen, andererseits mußten Gruppen vorhanden sein, die empfindlich gegenüber Reduktion

sind, z.B. S-S-Gruppen. Die Empfindlichkeit der EPSP-Synthase gegen Jodacetamid und p-CMBS sprach ebenfalls für das Vorhandensein freier SH-Gruppen.

Ein ausgeglichenes Reduktionsvermögen hatte ein Gemisch aus Cystein und DTE (5 mM:1 mM), da es zwar aktivierte, jedoch die Stabilität langfristig nicht herabsetzte.

b) Komplexbildner

Komplexbildner können neben einem stablilisierenden Effekt bei Schwermetall-empfindlichen Enzymen auch unter Umständen Aufschluß darüber geben, ob Metallionen, als Kosubstrate oder fest im aktiven Zentrum gebunden, für die Aufrechterhaltung der katalytischen Aktivität notwendig sind. In diesem Fall wäre, wenn die Metallionen vom Komplexbildner stärker gebunden werden als vom Enzym, eine Herabsetzung der Aktivität zu erwarten. EDTA cheliert divalente Metallionen mit hoher Effektivität bei neutralem pH-Wert (PRIBIL, 1961). CN^- bildet mit vielen Obergangsmetallen sehr stabile "low-spin-Komplexe" (HOLLEMANN u. WIBERG, 1976), ist jedoch ebenfalls in der Lage, einzelne freie Bindungsstellen zu blockieren, ohne das Metallion aus dem Protein herauszulösen.

Wie Tabelle4 zeigt, führte ein weiterer Zusatz von EDTA oder KCN zu einer geringfügigen Erhöhung der Stabilität der EPSP-Synthase. Ohne EDTA war die Stabilität drastisch herabgesetzt.

Tabelle 4 : Einfluß von Komplexbildnern auf die Stabilität der EPSP-Synthase

	Enzymaktivität in % der Ausgangsaktivität nach	
	10 min	48 h
Kontrolle (1 mM EDTA)	100	48
+ 5 mM EDTA	94	66
+ 5 mM KCN	100	56
ohne EDTA (durch Dialyse abgetrennt)	n.b.	5

c) Osmotisch aktive Verbindungen

Glycerin und insbesondere Saccharose waren in der Lage, die Aktivität der EPSP-Synthase beträchtlich zu stabilisieren. KCl dagegen zeigte genau den gegenteiligen Effekt (Tabelle 5).

Tabelle 5: Einfluß von osmotisch aktiven Verbindungen auf die Stabilität der EPSP-Synthase

	Aktivität in % der Ausgangsaktivität nach	
	17 h[+]	48 h
Kontrolle	81	48
20% Glycerin (v/v)	n.b.	72
20% Saccharose (w/v)	n.b.	97
0.1 M KCl	28	n.b.

[+]Inkubation bei 4°C

Dies war insofern nicht ohne Bedeutung, da KCl während der Reinigung benutzt wurde, um das Enzym von Ionenaustauschern freizusetzen. Es erschien daher sinnvoll, diese Verbindung nach einem solchen Schritt möglichst umgehend wieder zu entfernen.

3.9. Einfluß von Kationen auf die Aktivität der EPSP-Synthase

Ziel dieser Versuche war es, eine eventuell vorhandene Abhängigkeit der EPSP-Synthase-Aktivität von Kationen im Sinne einer Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit oder auch Inaktivierung zu erkennen. Daneben sollte aber auch festgestellt werden, ob eine Veränderung der Alkali-Ionen-Konzentration besonders bei niedrigen Substratkonzentrationen die Umsetzungsgeschwindigkeit beeinflußt,

da während einer systematischen Veränderung der Substratkonzentrationen (K_M-Bestimmung) auch die Konzentration der Kationen - im wesentlichen Na^+ - verändert wird.

3.9.1. Erdalkali- und Schwermetallionen

In diesen Experimenten wurden die Reaktionsansätze ohne Substrat 5 min vorinkubiert und dann durch Zugabe des Substratgemisches gestartet. Nach weiteren 5 min wurde die Menge des gebildeten Phosphats bestimmt. In allen Fällen wurde eine Kontrolle ohne Enzym durchgeführt, da einige Verbindungen direkt Phosphat aus den Substraten freisetzten.

In 10 mMolaren Konzentrationen konnte kein aktivierender Einfluß der untersuchten Verbindungen festgestellt werden (Tabelle 6).

Tabelle 6 : Einfluß von 10 mM Metallionen auf die Aktivität der EPSP-Synthase

	Aktivität in % der Kontrolle	Löslichkeitsprodukt des Metallsulfids (aus:D'ANS u.LAX,1967)
$MgCl_2$	97	
$CaCl_2$	97	
$SrCl_2$	97	
$Ba(Acetat)_2$	100	
$NaVO_3$	93	
$NiCl_2$	92	3×10^{-21}
$MnSO_4$	84	7×10^{-16}
$CoCl_2$	75	2×10^{-27}
$AlCl_3$	63	
$FeCl_3$	41	
$Zn(Acetat)_2$	11	6.9×10^{-26}
$CuSO_4$	9	8×10^{-45}
$Pb(Acetat)_2$	6	3.4×10^{-28}
$LaCl_3$	0	
$(NH_4)_6Mo_7O_{14}$	0	
$FeCl_2$	0	3.7×10^{-19}

Während Erdalkaliionen überhaupt keinen Einfluß hatten, war in Anwesenheit von Obergangs- und Schwermetallionen eine deutliche bis vollständige Hemmung der Aktivität zu beobachten.

In erster Annäherung schien die Stärke der Hemmung mit abnehmendem Metallsulfid-Löslichkeitsprodukt zuzunehmen (Ausnahme: $FeCl_2$). Dies könnte für die Existenz freier SH-Gruppen im Enzym sprechen.

3.9.2. Einfluß von Alkaliionen

Der Einfluß von Alkaliionen wurde bei zwei verschiedenen Konzentrationen jeweils beider Substrate, nämlich 5 mM und 0.2 mM, untersucht.

Alkalichloride hatten bei 5 mM Substratkonzentration nur in sehr hoher Konzentration einen geringfügigen hemmenden Einfluß, in niedrigen Konzentrationen konnte keine Veränderung der Reaktionsgeschwindigkeit festgestellt werden. Das Ausmaß des Effektes war für alle untersuchten Verbindungen gleich, lediglich NH_4Cl hemmte etwas stärker (Abb.41).

Wurde die Konzentration der Substrate allerdings auf 0.2 mM reduziert, so gewann die Ionenkonzentration im Ansatz einen großen Einfluß auf die Enzymaktivität. In niedrigen Konzentrationen stieg die Enzymaktivität mit der Ionenkonzentration stark an, erreichte bei ca. 100 mM ein Maximum und fiel bei höheren Konzentrationen wieder ab Abb. 41).

Die Tatsache, daß alle untersuchten Salze die Enzymaktivität in gleichem Maße beeinflußten - lediglich NH_4Cl hemmte auch hier wieder etwas stärker - legte allerdings den Verdacht nahe, daß nicht die Kationen sondern die Anionen entscheidend für die Ausprägung dieses Effektes waren, da sich die Alkaliionen hinsichtlich ihrer Eigenschaften wie Ionenradius und Ladungsdichte deutlich voneinander unterscheiden.

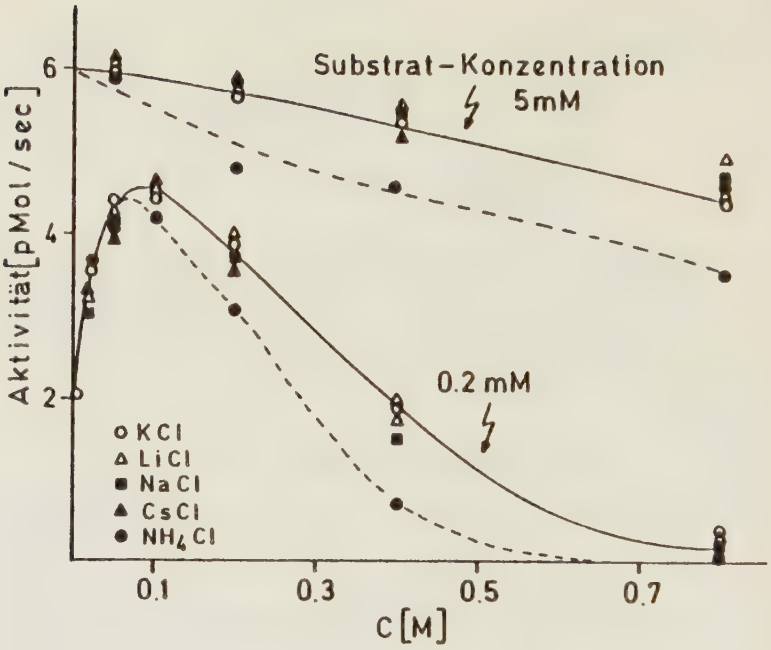


Abb. 41: Einfluß von Alkalionen auf die Aktivität der EPSP-Synthase bei niedrigen und hohen Substratkonzentrationen

3.10. Einfluß von Anionen auf die Aktivität der EPSP-Synthase

3.10.1. Anorganische Anionen

Es wurden verschiedene anorganische Anionen in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt und die Aktivität der EPSP-Synthase bei niedriger Substratkonzentration bestimmt. Als Kationen wurden K^+ und Na^+ verwendet. Im wesentlichen zeigte sich bei allen Verbindungen der schon in Punkt III.3.9.2. beschriebene Effekt: Aktivierung bei niedrigen Salzkonzentrationen, Verlangsamung der Umsetzungsgeschwindigkeit bei höheren Konzentrationen.

Während unterschiedliche Alkalionen bei gleichem Anion jedoch ein einheitliches Beeinflussungsmuster zeigten (siehe III.3.9.2.) führten unterschiedliche Anionen in

jedem untersuchten Falle auch zu einer hinsichtlich Lage und Höhe des Maximums unterschiedlichen Optimumkurve (Abb. 42)

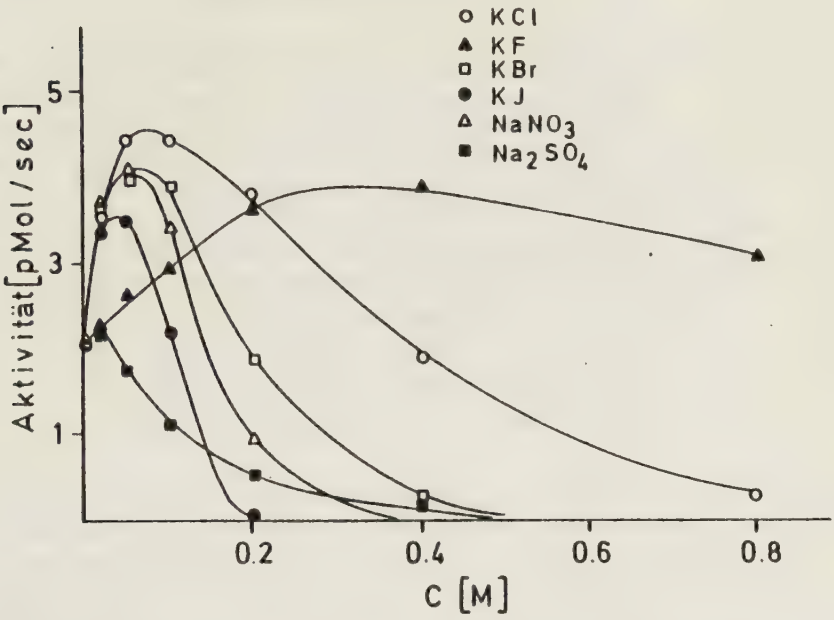


Abb. 42 : Einfluß von verschiedenen Anionen auf die Aktivität der EPSP-Synthase bei niedrigen Substratkonzentrationen (je 0.2 mM)

Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß die Anionen und nicht die Kationen für das Auftreten dieses Effektes verantwortlich sind.

Beide Flanken der Kurve wurden anscheinend in verschiedener Art und Weise beeinflußt : hinsichtlich der Hemmung der Enzym-Aktivität konnte eine klare Reihung der Anionen in der Folge $SO_4^{2-} > NO_3^- > J^- > Br^- > Cl^- > F^-$ vorgenommen werden. Die Aktivierung dagegen schien in nahezu allen Fällen - mit Ausnahme von F^- und vielleicht SO_4^{2-} - in etwa gleicher Form zu verlaufen. Es besteht daher die Möglichkeit, daß Hemmung und Aktivierung durch die Anionen auf unterschiedliche Art und Weise, etwa durch unterschiedliche Bindungs-

stellen am Enzym, zustande kommen.

3.10.2. Einfluß von Puffersystemen

Da Puffersysteme naturgemäß Anionen enthalten, schien es wichtig, auch den Einfluß verschiedener Puffersysteme auf die Enzymaktivität bei niedrigen Substratkonzentrationen zu untersuchen, um Artefakte, insbesondere bei der Bestimmung der K_M-Werte, zu vermeiden.

An den untersuchten Puffersystemen fiel auf, daß die Sulfonsäuregruppen enthaltenden Puffer Hepes, Mes und Pipes zwar in wenn auch unterschiedlichem Maße aktivierend auf die EPSP-Synthase wirkten, im untersuchten Konzentrationsbereich eine Hemmung jedoch nicht beobachtet werden konnte (Abb. 43).

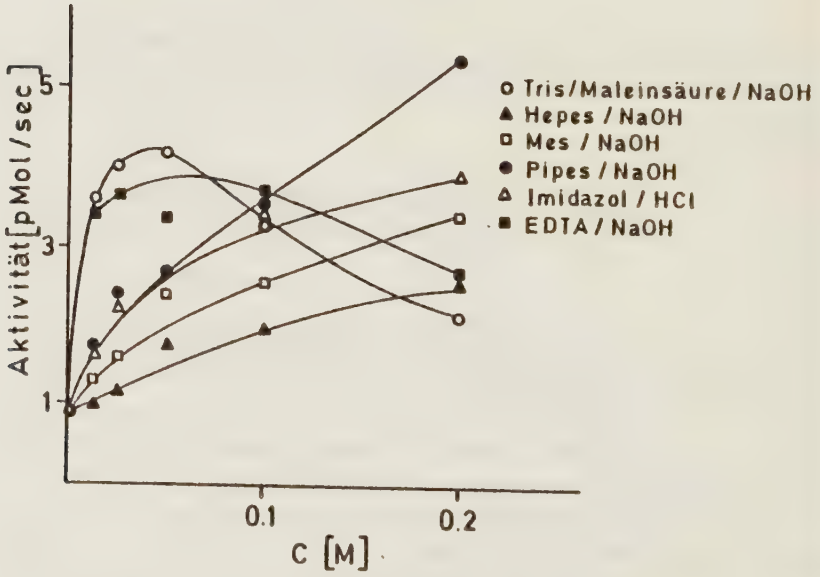


Abb. 43: Abhängigkeit der EPSP-Synthase-Aktivität bei niedrigen Substratkonzentrationen (je 0.2 mM) von der Konzentration verschiedener Puffersysteme bei pH 6.8

Imidazol/HCl konnte dabei nicht direkt verglichen werden, da die Konzentrationsangabe sich auf das Imidazol, nicht jedoch auf auf das Anion Cl^- bezog.

Die Carboxylgruppen enthaltenden Puffersysteme Tris/Maleinsäure/NaOH und EDTA/NaOH zeigten jedoch die schon bei den anorganischen Anionen erhaltenen Optimumskurven.

Von allen untersuchten Puffersystemen war der Einfluß auf die Enzymaktivität bei der Verwendung von Hepes/NaOH am geringsten, in Konzentrationen unter 30 mM konnte er nahezu vernachlässigt werden. Hepes/NaOH wurde daher als Standardpuffer für die Aktivitätsbestimmungen der EPSP-Synthase gewählt.

3.10.3. Einfluß des pH-Wertes

Eine durch Anionen verursachte Aktivitätsänderung von Enzymen kann, wie es z.B. für die Amylase (MYRBÄCK, 1926) und die Fumarat-Hydratase (MASSEY, 1953) beschrieben wurde, durch eine Verschiebung des pH-Optimums verursacht werden.

Untersuchungen bei vier verschiedenen Pufferkonzentrationen (variiertes Anion: Maleinsäure) und niedriger Substratkonzentration machten jedoch deutlich, daß der pH-Bereich maximaler Aktivität nicht verschoben wird (Abb. 44).

Die Form der Kurve änderte sich dabei geringfügig. Auffallend ist, daß von den beiden Maxima bei 5 mM Substratkonzentration (siehe III.3.5.1.) in diesem Falle das Maximum bei pH 5.2 nicht ausgeprägt ist.

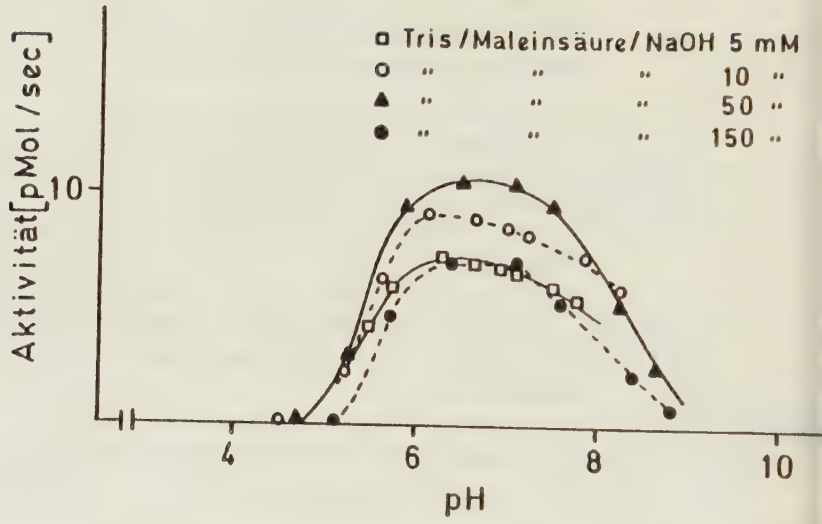


Abb. 44 : Abhängigkeit der EPSP-Synthase-Aktivität bei niedrigen Substratkonzentrationen (je 0.2 mM) und unterschiedlichen Pufferkonzentrationen vom pH-Wert

3.11. Bestimmung der Substratbindungskonstanten

Für enzymatisch katalysierte Reaktionen mit zwei Substraten wurde eine Reihe verschiedener möglicher Reaktionsmechanismen vorgeschlagen (siehe CLELAND, 1970).

Im wesentlichen können diese auf zwei verschiedene Grundmechanismen zurückgeführt werden: Ping-Pong-Mechanismen und Mechanismen, die einen ternären Substrat 1-Enzym-Substrat 2-Komplex voraussetzen.

LEVIN und SPRINSON (1964) schlugen für die EPSP-Synthase einen reversiblen Additions-Eliminierungsmechanismus vor, der die Bildung eines ternären Komplexes zur Grundlage hat.

Ein allgemeines Reaktionsschema für einen solchen Mechanismus ist in Abb.45 dargestellt.

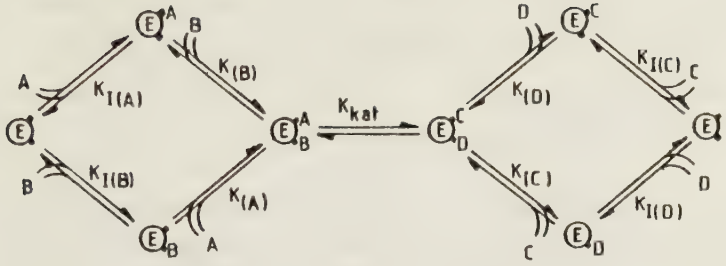


Abb. 45: Allgemeines Reaktionsschema für Reaktionen mit zwei Substraten
(nach BISSWANGER, 1979; verändert)

$K_{I(A)}$ und $K_{I(B)}$ sind die Dissoziationskonstanten der Komplexe EA bzw. EB, $K_{(A)}$ und $K_{(B)}$ sind die MICHAELIS-Konstanten für die Substrate A und B, d.h. die Dissoziationskonstanten des jeweils mit dem anderen Substrat gesättigten EAB-Komplexes. Entsprechendes gilt für die Produkte C und D.

Ist von den beiden theoretisch möglichen Wegen zu EAB nur einer realisiert, spricht man von einem geordneten Mechanismus, d.h. nur eines der beiden Substrate kann als erstes gebunden werden. Bei einem Zufallsmechanismus dagegen kann das eine oder das andere Substrat als jeweils erstes an das Enzym angelagert werden.

Zur Bestimmung der Bindungskonstanten wurde jeweils ein Substrat über einen möglichst weiten Konzentrationsbereich variiert ("variables Substrat"), das andere jeweils in mehreren relativ hohen Konzentrationen "konstant" gehalten ("konstantes Substrat").

Aus den Steigungen und den Schnittpunkten mit der Ordinate der durch eine Lineweaver-Burk -Darstellung erhaltenen Geraden lassen sich in Sekundärdiagrammen die Bindungs-

konstanten ermitteln (siehe CLELAND, 1970). Die Berechnung von Schnittpunkten mit den Koordinatenachsen und Steigungen der erhaltenen linearen Bereiche erfolgte mit Hilfe der Linearen Regression.

3.11.1. Hinreaktion

Die Konzentrationen beider Substrate, PEP und S-3-P, wurden über einen möglichst großen Konzentrationsbereich variiert. Die Empfindlichkeit des verwendeten Testsystems setzte jedoch eine untere Grenze, da einerseits ein genügender Stoffumsatz vorhanden sein muß, um die Menge des gebildeten Produktes mit hinreichender Genauigkeit zu bestimmen, andererseits die Umsetzung schon relativ geringer Substratmengen bei niedrigen Substratkonzentrationen (besonders im Bereich der K_M und darunter) eine deutliche Abweichung von der Linearität zur Folge hat. Diese untere Substratkonzentration lag bei etwa 80 µM.

Die doppelt reziproke Darstellung mit S-3-P als variablem, PEP als konstantem Substrat zeigte keine lineare Abhängigkeit der beiden Variablen 1/S und 1/v voneinander (Abb.46).

Für S-3-P-Konzentrationen $\leq$ 0.2 mM ließ sich der Kurvenverlauf jedoch durch Geraden wiedergeben. Die aus diesen linearen Bereichen erhaltenen Geraden schnitten sich in einem Punkt oberhalb der y-Achse, der Kehrwert der x-Koordinate des Schnittpunktes wurde mit 26 µM ermittelt.

Stieg die S-3-P-Konzentration über 0.2 mM an, so wich der erhaltene Graph deutlich von der Linearität in Richtung auf höhere Reaktionsgeschwindigkeiten ab, die Krümmung war konkav bezüglich der Abzisse. Alle erhaltenen Kurven schienen einem gemeinsamen Schnittpunkt zuzustreben, der auf oder in der Nähe der Ordinate lag.

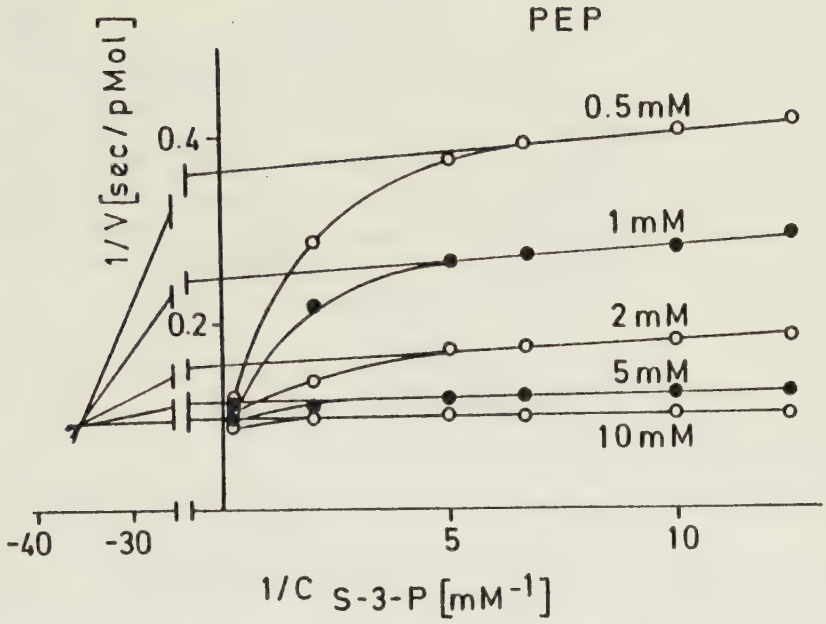


Abb. 46: Doppelt reziproke Darstellung der Abhängigkeit der Umsatzgeschwindigkeit der Hinreaktion von der S-3-P-Konzentration

Wurde der Kehrwert der PEP-Konzentration auf der Abzisse aufgetragen, zeigte sich ein linearer Zusammenhang zwischen beiden Variablen für PEP $\geq$ 1 mM (Abb. 47).

Die daraus erhaltenen Geraden schnitten sich in einem Punkt auf der Ordinate. Unterschritt die PEP-Konzentration 1 mM, so wichen die Werte von der Geraden in Richtung auf die Abzisse, d.h. zu höheren Geschwindigkeiten ab.

Betrachtet man nur die jeweils linearen Bereiche, d.h. nur die mit niedrigen S-3-P- (< 0.2 mM) und hohen PEP-Konzentrationen (> 1 mM) erhaltenen Werte, so sind die erhaltenen Geraden-Muster durch eine recht einfache Theorie zu erklären. Sie entsprechen einem "equilibrium ordered" - Mechanismus (CLELAND, 1977): S-3-P wird obligatorisch zuerst, PEP als zweites Substrat gebunden; die Geschwindigkeitskonstanten sind gegenüber den Geschwindigkeitskonstanten der Anlagerung des zweiten Substrates PEP und der Um-

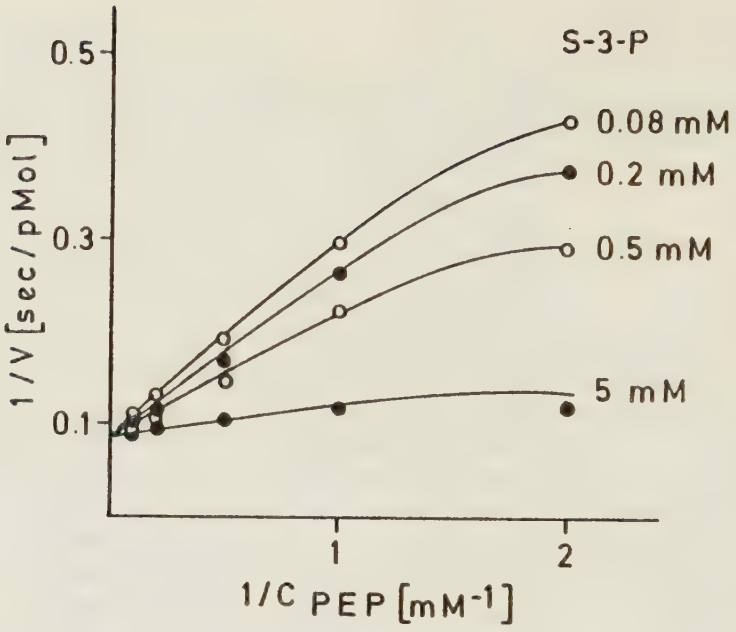


Abb. 47 : Doppelt reziproke Darstellung der Abhängigkeit der Umsatzgeschwindigkeit der Hinreaktion von der PEP-Konzentration (hohe PEP-Konzentration)

setzungskonstanten K_{kat} so groß, daß sich die Reaktion E + S-3-P → E-S-3-P im thermodynamischen Gleichgewicht befindet. Dies hat zur Folge, daß sich durch sehr hohe Konzentrationen des zweiten Substrates PEP die Einstellung der maximalen Umsatzgeschwindigkeit V_{max} unabhängig von der S-3-P-Konzentration erzwingen läßt, da durch die hohe PEP-Konzentration die Gleichgewichtslage der Teilreaktion E + S-3-P → E-S-3-P durch Abziehen des Produktes auch bei niedrigen S-3-P-Konzentrationen so weit nach rechts verlagert werden kann, daß die Konzentration des freien Enzyms E praktisch gleich 0 wird.

Das gleiche Geradenmuster in den Lineweaver-Burk -Diagrammen kann man auch erhalten, wenn die zuerst angelagerte Verbindung (S-3-P) nur als Aktivator wirkt. Dieser Aktivator braucht sich nicht nach jedem Umsetzungsvorgang wieder vom Enzym zu lösen; jedoch ist wichtig, daß er nicht mehr ab-

dissozieren kann, sobald die zweite Verbindung (PEP) sich an das Enzym angelagert hat (CLELAND, 1977).

Die aus den beiden Abbildungen 46 und 47 abgeleiteten Sekundärdiagramme (Abb. 48, Abb. 49) stellen lineare Beziehungen zwischen den jeweiligen Variablen dar, lediglich die Auftragung der Steigung aus Abb.49 gegen den Kehrwert der PEP-Konzentration führt zu einer bezüglich der x-Achse konkaven Kurve, die jedoch für S-3-P-Werte < 0.2 mM in eine Gerade übergeht.

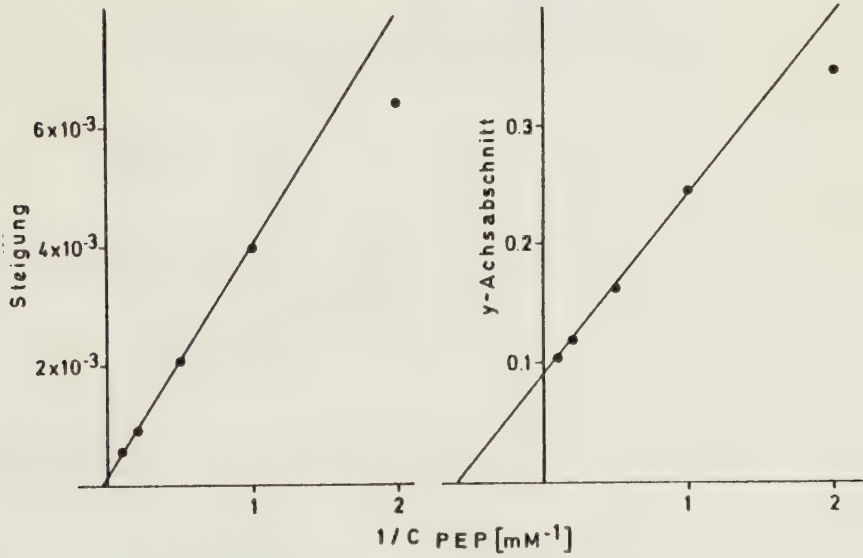


Abb. 48: Sekundärdiadramme zu Abb. 46. Abhängigkeit der Steigung und des y-Achsenabschnittes der in Abb. 46 erhaltenen Geraden von dem Kehrwert der PEP-Konzentration

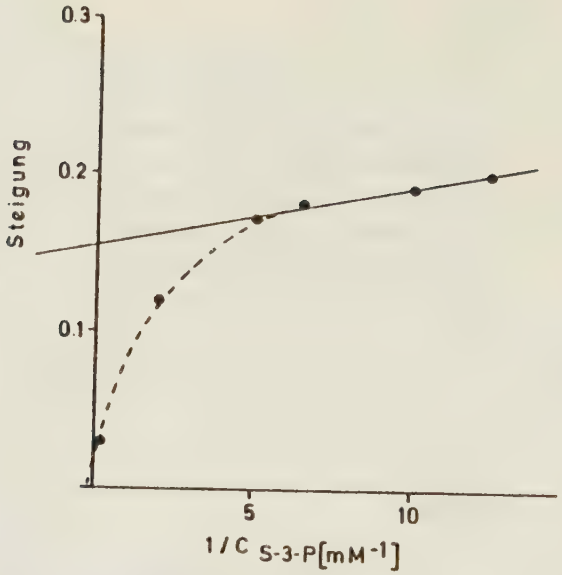


Abb. 49: Sekundärdiagramm zu Abb. 47. Abhängigkeit der Steigung der in Abb. 47 erhaltenen Geraden von dem Kehrwert der S-3-P-Konzentration

Da aus dem Schnittpunkt einer aus einer solchen Abbildung erhaltenen Geraden mit der x-Achse $1/K_{I(S\text{-}3\text{-}P)}$ bestimmt werden kann, mußte aus dem Kurvenverlauf geschlossen werden, daß die Dissoziationskonstante für S-3-P nur für kleine S-3-P-Konzentrationen konstant ist und dann mit dieser zunimmt. Eine Zusammenstellung der aus den Sekundärdiagrammen erhaltenen Substratbindungskonstanten gibt Tabelle 7.

Ein ganz analoges Bild ergab sich, wenn PEP als variables und S-3-P als konstantes Substrat eingesetzt wurde. Der Verlauf der Kurven in der doppelt reziproken Darstellung (Abb. 50) ähnelte stark derjenigen mit S-3-P als variablem Substrat (siehe Abb. 46). Die aus den Meßwerten für PEP $\leq$ 0.15 mM erhaltenen Geraden schnitten sich in einem Punkt über der Abzisse; überstieg die PEP-Konzentration 0.15 mM, krümmten sich die Kurven wiederum auf einen gemeinsamen Schnittpunkt auf oder in der Nähe der Ordinate zu.

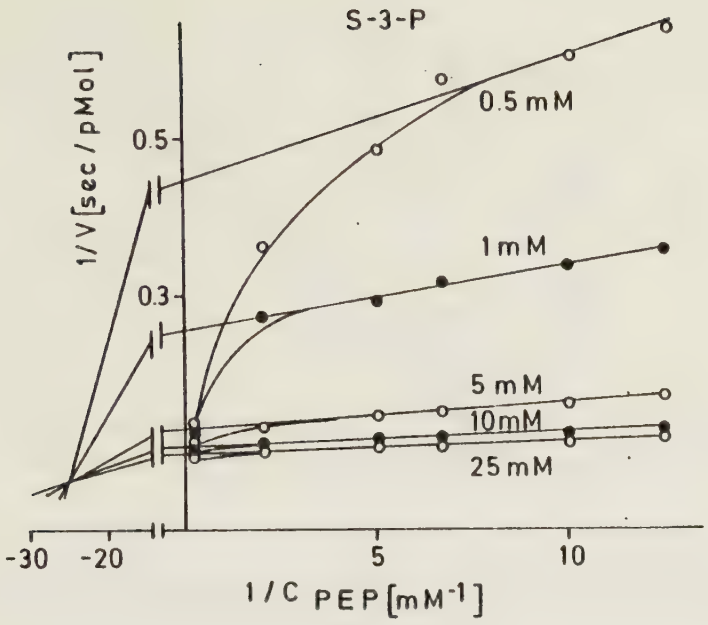


Abb. 50 : Doppelt reziproke Darstellung der Abhängigkeit der Umsatzgeschwindigkeit der Hinreaktion von der PEP-Konzentration

Wurden dagegen die gleichen Meßwerte in ein Diagramm mit dem Kehrwert der S-3-P-Konzentration auf der Abzisse aufgetragen, so ließen sich die erhaltenen Punkte für S-3-P > 1 mM zu einem Geradenbüschel verbinden, dessen gemeinsamer Schnittpunkt auf oder in der Nähe der Ordinate lag (Abb. 51).

Die aus den jeweils linearen Teilen beider Abbildungen erhaltenen Geradenmuster, d.h. bei niedriger PEP-Konzentration (< 0.15 mM) und hoher S-3-P-Konzentration (> 1 mM) lassen sich wiederum mit dem gleichen "equilibrium ordered"-Mechanismus erklären, diesmal jedoch mit PEP als obligatorisch zuerst gebundenem Substrat; also mit umgekehrter Reihenfolge der Substratbindung oder mit PEP als Aktivator.

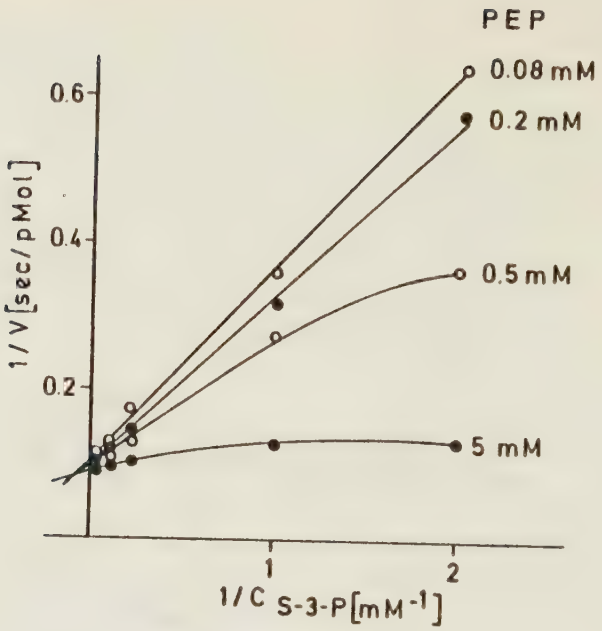


Abb. 51 : Doppelt reziproke Darstellung der Abhängigkeit der Umsatzgeschwindigkeit der Hinreaktion von der S-3-P-Konzentration (hohe S-3-P-Konzentration)

Die aus den Sekundärdiagrammen (Abb. 52 , Abb. 53) abgeleiteten Bindungskonstanten sind in Tabelle 7 zusammengefaßt. Wiederum zeigte lediglich eines der Sekundärdiagramme keine lineare x/y-Abhängigkeit (Abb.53): ab einer PEP-Konzentration von 0.2 mM wurde $K_{I(PEP)}$ abhängig von der PEP-Konzentration und nahm mit ihr zu.

Im Prinzip ließen sich alle vier erhaltenen Primärdiagramme zu zwei Abbildungen zusammenfassen, da Abb. 51 einen Teilbereich aus Abb. 46 , und Abb. 47 einen Teilbereich aus Abb. 50 darstellte.

Lineare Bereiche in beiden Darstellungen ergaben sich immer, wenn eines der beiden Substrate in sehr hohen, das andere in sehr niedrigen Konzentrationen eingesetzt wurde. Unter diesen Bedingungen ließ sich jeweils ein Reaktionsmechanismus

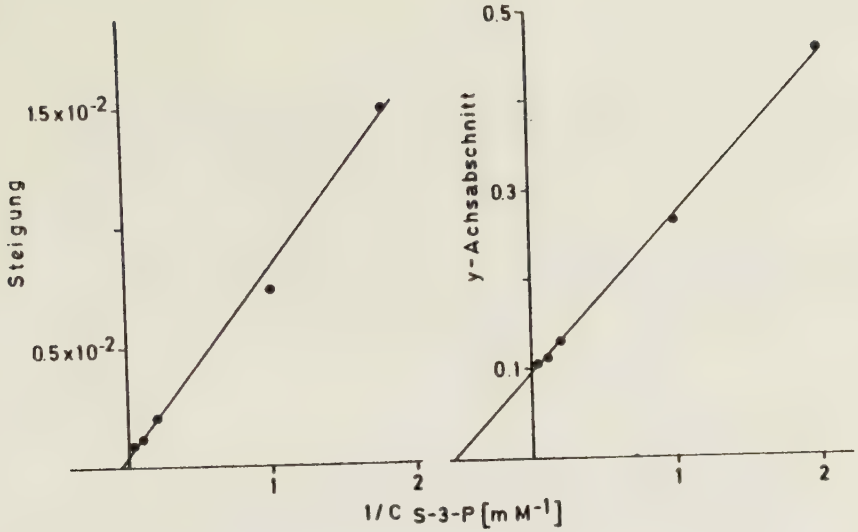


Abb. 52 : Sekundärdiagramme zu Abb.50 . Abhängigkeit der Steigung und des y-Achsenabschnittes der in Abb.50 erhaltenen Geraden von dem Kehrwert der S-3-P-Konzentration

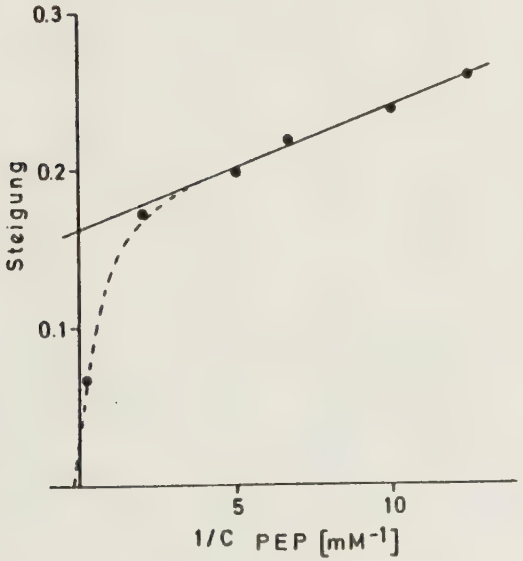


Abb. 53 : Sekundärdiagramm zu Abb. 51 . Abhängigkeit der Steigung der in Abb. 51 erhaltenen Geraden von dem Kehrwert der PEP-Konzentration

Tabelle 7 : Zusammenstellung der Substratbindungskonstanten der EPSP-Synthase

ermittelt aus Abb.	Substratkonzentrationen PEP	S-3-P	$K_{I(PEP)}$	$K_{I(S-3-P)}$	$K_{(PEP)}$	$K_{(S-3-P)}$
48	> 1 mM	< 0.2 mM	-	-	1.7 mM	-
48	> 1 mM	< 0.2 mM	-	24 µM	-	-
49	> 1 mM	< 0.2 mM > 0.2 mM	-	22 µM > 22 µM	-	-
52	< 0.2 mM	> 1 mM	-	-	-	1.7 mM
52	< 0.2 mM	> 1 mM	43 µM	-	-	-
53	< 0.2 mM > 0.2 mM	> 1 mM	45 µM > 45 µM	-	-	-

mit obligatorischer Reihenfolge der Substrate in der Bindung an das Enzym ableiten, der jedoch immer die Bindung des niedrig konzentrierten Substrates vor dem hoch konzentrierten an das Enzym voraussetzte.

Daneben schienen die Dissoziationskonstanten beider Substrate ab einem bestimmten Schwellenwert abhängig von der Konzentration der jeweiligen Substrate zu sein.

3.11.2. RÜckreaktion

Das Lineweaver-Burk-Diagramm zeigte sowohl mit EPSP als variablem als auch mit P_i als variablem Substrat jeweils eine Geradenschar, die sich auf der x-Achse schnitten (Abb. 54, Abb. 55).

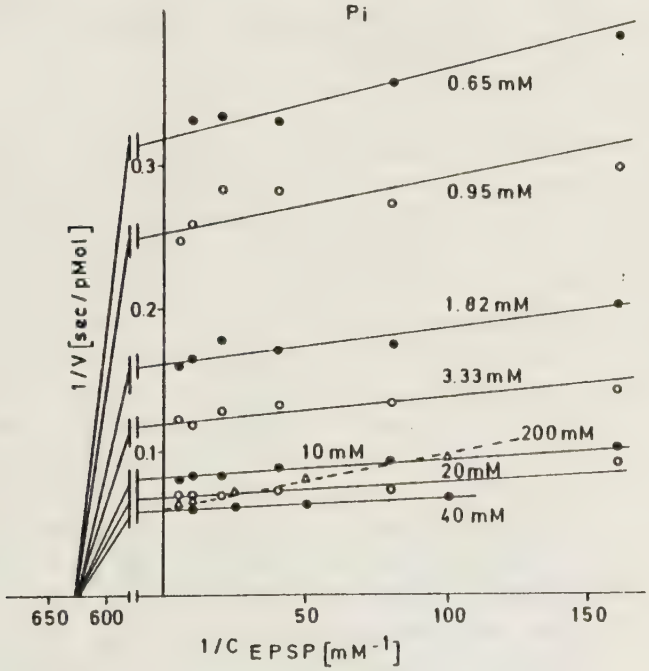


Abb. 54 : Doppelt reziproke Darstellung der Abhängigkeit der Umsetzungsgeschwindigkeit der RÜckreaktion von der EPSP-Konzentration

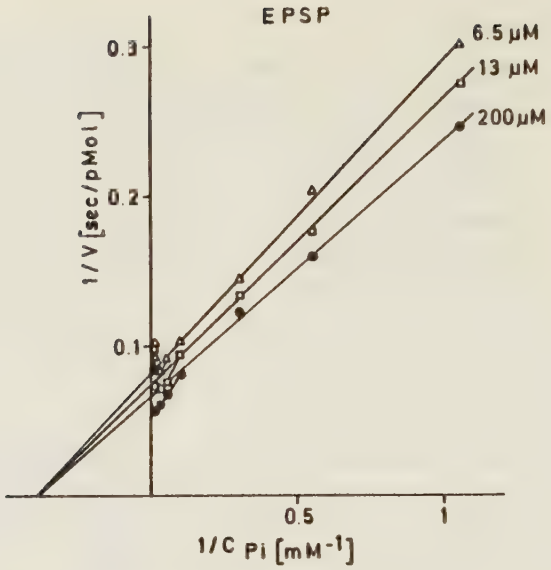
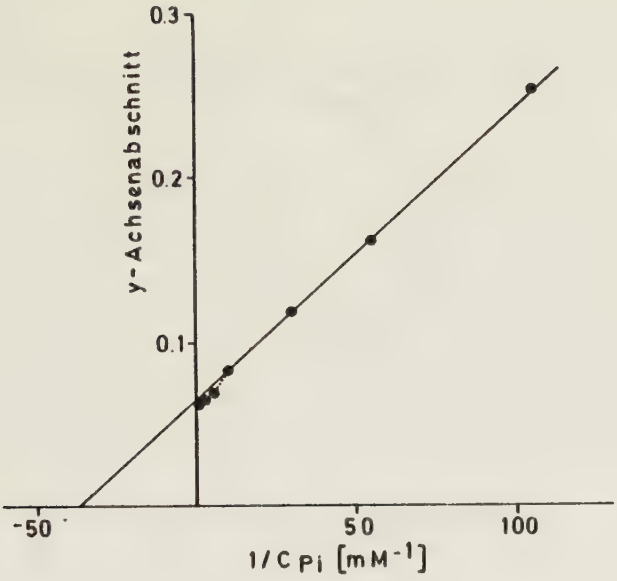


Abb. 55 : Doppelt reziproke Darstellung der Abhängigkeit der Umsetzungsgeschwindigkeit der Rückreaktion von der Phosphatkonzentration

Während im ersten Fall über den gesamten Meßbereich der Kehrwert der Reaktionsgeschwindigkeit proportional dem Kehrwert der EPSP-Konzentration war, ließ sich im zweiten Fall eine Abweichung von der Linearität beobachten, wenn die P_i-Konzentration größer als 10 mM wurde. Eine anfängliche Abweichung in Richtung auf höhere Umsetzungsgeschwindigkeiten, wie es auch bei der Hinreaktion beobachtet werden konnte, wurde bei weiterer Steigerung der P_i-Konzentration durch Substrathemmung überlagert. Dieser Effekt ist kompetitiv hinsichtlich des zweiten Substrates EPSP (Abb.56).Da beide Geradenscharen sich jeweils auf der x-Achse schnitten, wurde $K_{I(P_i)} = K_{(P_i)}$ und $K_{I(EPSP)} = K_{(EPSP)}$, d.h. die Affinität des Enzyms zu den Substraten war unabhängig von der Reihenfolge der Bindung der Substrate an das Enzym. Die beiden Bindungskonstanten wurden in Sekundärdiagrammen (Abb. 56, Abb. 57) bestimmt:

$K_{EPSP} = 1.3$ µM ; $K_{P_i} = 2.6$ mM



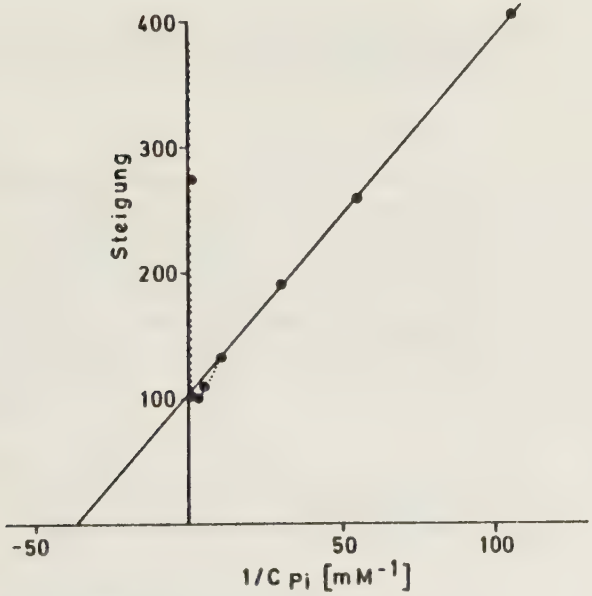


Abb. 56 : Sekundärdiagramme zu Abb. 54 . Abhängigkeit des y-Achsenabschnittes und der Steigung der in Abb. 54 erhaltenen Geraden vom Kehrwert der P_i-Konzentration

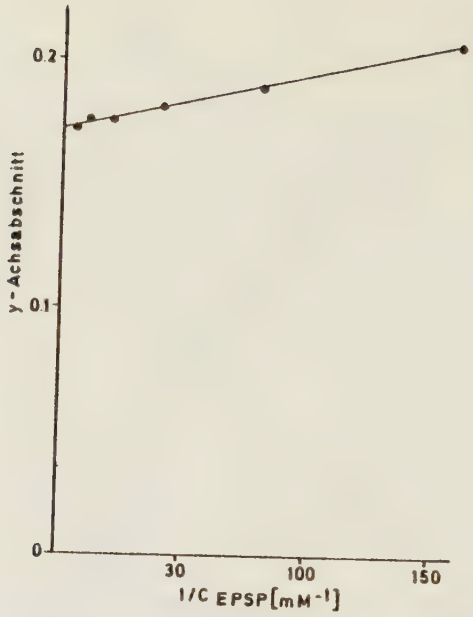


Abb. 57: Sekundärdiagramm zu Abb. 55. Abhängigkeit des y-Achsenabschnittes der in Abb. 55 erhaltenen Geraden vom Kehrwert der EPSP-Konzentration

Wie aus Abb. 55 zu erkennen ist, änderte sich der Schnittpunkt des Geradenbüschels, wenn die P_i-Konzentration 10 mM überschreitet. Da der Schnittpunkt in Richtung auf den Ursprung des Koordinatensystems verschoben wurde, änderte sich $K_{(P_i)}$ zu höheren Werten. Eine Erhöhung der P_i-Konzentration bewirkte also eine geringere Affinität des Enzyms zu P_i.

3.12. Untersuchung zur Reihenfolge der Bindung der Substrate

Die Frage, ob eine feste Reihenfolge der Substratbindung an das Enzym vorliegt (geordneter Mechanismus), oder ob jedes der beiden Substrate als erstes gebunden werden kann (Zufallsmechanismus), läßt sich durch eine Untersuchung

der Art der Hemmung klären, die die jeweiligen Produkte auf die Enzymaktivität ausüben (siehe CLELAND, 1970; CLELAND, 1977).

Aus technischen Gründen war es nicht möglich, jeweils beide Produkte in beiden Reaktionsrichtungen auf ihre Hemmwirkung zu untersuchen. So mußte der Zusatz des jeweils gemessenen Reaktionsproduktes, d.h. Phosphat bei der Hinreaktion und PEP bei der Rückreaktion, unterbleiben.

Weiterhin mußten sich die Untersuchungen auf Substratkonzentrationen beschränken, in denen eine lineare Abhängigkeit zwischen 1/v und 1/S erhalten werden konnte (siehe III.3.11.).

Das Ergebnis ist in Tabelle 8 zusammengefaßt:

Tabelle 8 : Einfluß der jeweiligen Produkte auf die von der EPSP-Synthase katalysierten Reaktion

variables Substrat	Produkt	Hemmtyp	Referenz
PEP (Hinreaktion)	EPSP	kompetitiv	Abb. 58
S-3-P (Hinreaktion)	EPSP	kompetitiv	Abb. 59
P_i (Rückreaktion)	S-3-P	nicht kompetitiv	Abb. 60
EPSP (Rückreaktion)	S-3-P	kompetitiv	Abb. 61

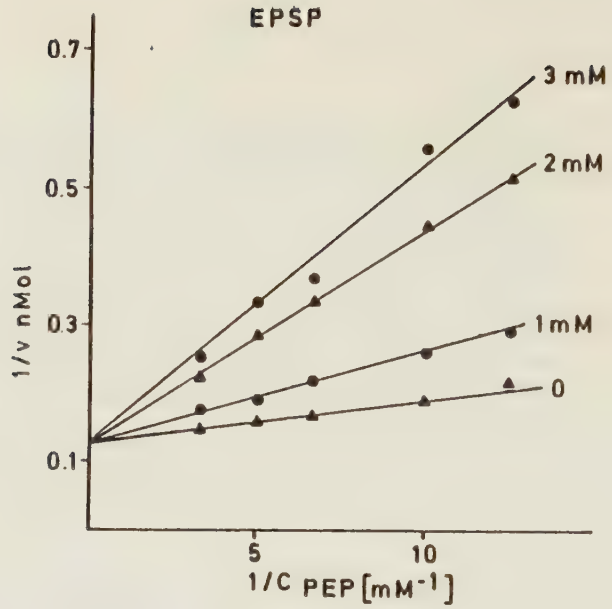


Abb. 58 : Lineweaver-Burk-Diagramm der Hemmung der Hinreaktion durch EPSP mit PEP als variiertem Substrat (S-3-P = 5 mM)

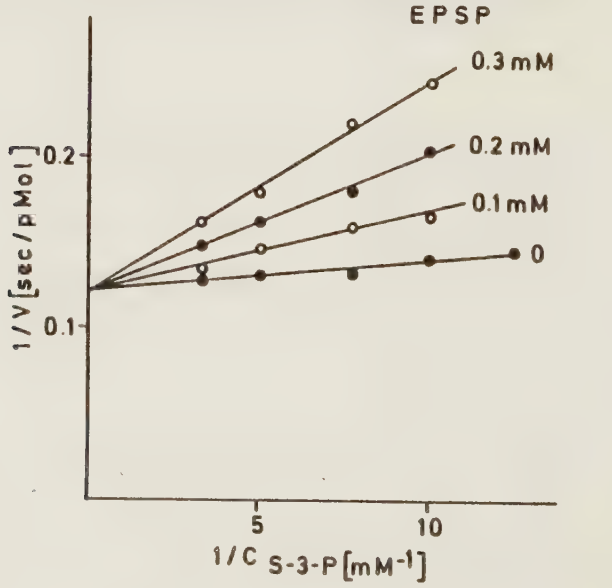


Abb. 59 : Lineweaver-Burk-Diagramm der Hemmung der Hinreaktion durch EPSP mit S-3-P als variiertem Substrat (PEP = 5 mM)

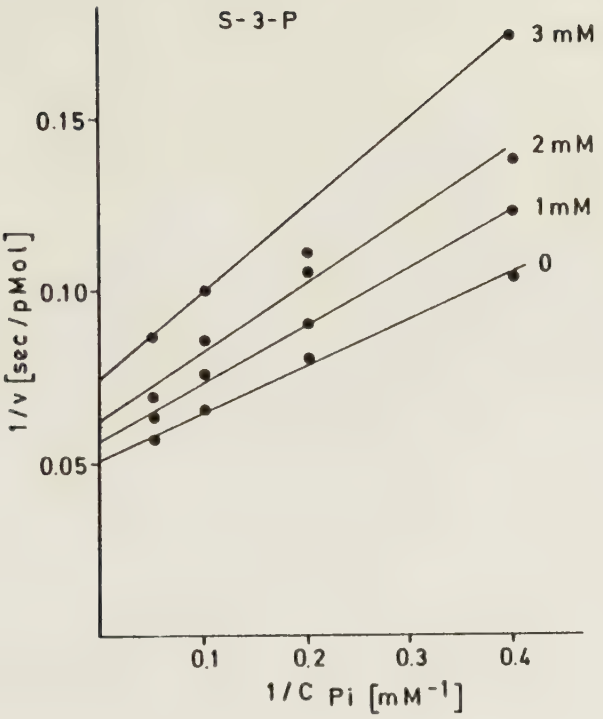


Abb. 60 : Lineweaver-Burk-Diagramm der Hemmung der Rückreaktion durch S-3-P mit P_i als variiertem Substrat (EPSP = 0.2 mM)

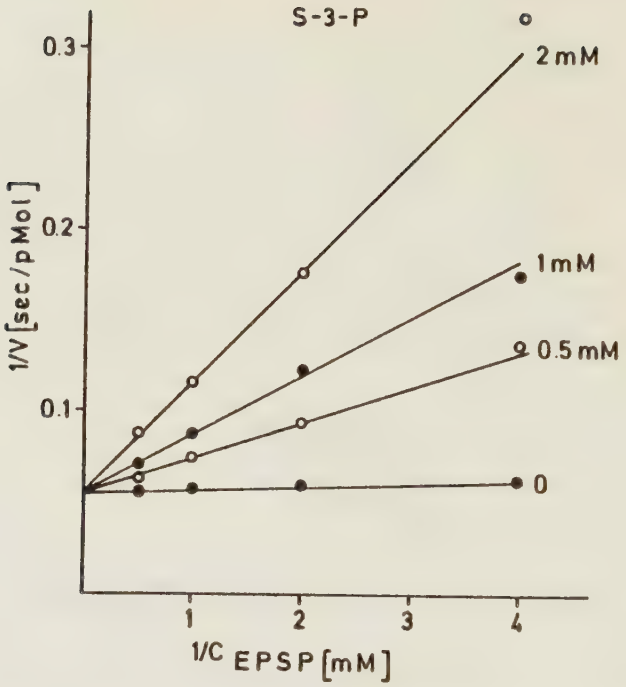


Abb. 61: Lineweaver-Burk-Diagramm der Hemmung der Rückreaktion durch S-3-P mit EPSP als variiertem Substrat (P_i = 20 mM)

In der Hinreaktion konnten beide Substrate, PEP und S-3-P, als jeweils erstes gebunden werden, da die Hemmung durch EPSP in beiden Fällen kompetitiv war und EPSP, das ja bis auf den Phosphatrest das ganze Gerüst beider Substrate enthält, sowohl mit S-3-P als auch mit PEP um deren jeweilige Bindungsstellen konkurrieren sollte. Es ist daher ein Zufallsmechanismus anzunehmen.

Hinsichtlich der Rückreaktion kann keine klare Aussage gemacht werden. S-3-P hemmte nicht kompetitiv bezüglich P_i, jedoch mußte dieser Hemmtyp erwartet werden - unabhängig davon, ob P_i oder EPSP zuerst gebunden wird - da P_i wohl an die Phosphatbindungsstelle von PEP angelagert wird und daher nicht mit S-3-P um den gleichen Bindungsort kon-

kurrieren kann: es kommt zur Ausbildung eines "dead-end-Komplexes" mit P_i und S-3-P im aktiven Zentrum.

Daraus folgt andererseits, daß die Hemmung durch S-3-P in jedem Falle kompetitiv bezüglich EPSP sein muß, da ein anderer Hemmtyp nur dann erwartet werden könnte, wenn die Bindung von S-3-P auch die Bindung von P_i beeinflußt.

Ohne die Anwendung anderer Methoden ist daher eine Aussage über die Bindungssequenz für die Rückreaktion nicht möglich. Leider konnte die EPSP-Synthase aus A. aerogenes nur in sehr geringen Mengen gewonnen werden, so daß eine Untersuchung mit Hilfe anderer als kinetischer Methoden nicht durchführbar war.

4. Einfluß von Glyphosat und anderer Verbindungen auf die Aktivität der EPSP-Synthase

4.1. Reversibilität der Hemmung durch Glyphosat

Zur Oberprüfung der Reversibilität der Hemmung wurden zwei Reaktionsansätze mit jeweils dem zehnfachen Volumen des Standardreaktionsansatzes - jedoch ohne die Substrate - von denen einer 1 mM Glyphosat enthielt,5 min auf 30°C erwärmt. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe des Substratgemisches gestartet und die Ansätze bei 30°C weiter inkubiert. Nach 1, 3, 5, 7 und 9 min wurde jeweils ein Aliquot zur Phosphatbestimmung entnommen, dann die Ansätze in Dialyseschläuche überführt und in getrennten Gefäßen über Nacht gegen je 300 ml Hepes/NaOH pH 6.8, der 1 mM EDTA und 1 mM DTE enthielt, unter zweimaligem Pufferwechsel bei 0 - 4°C dialysiert.
Anschließend wurde die Aktivität bestimmt wie oben beschrieben.

Aktivität	Kontrolle	1 mM Glyphosat
vor Dialyse	100% (= 55 pMol/sec)	7.9%
nach Dialyse	59.3%	64.9%

Während anfangs eine starke Herabsetzung der Enzymaktivität durch Glyphosat zu beobachten war, entsprach die Umsatzrate nach der Dialyse der der dialysierten Kontrolle.
Da sich Glyphosat durch Dialyse vom Enzym abtrennen ließ, kann man von einer reversiblen Hemmung sprechen.

4.2. Bestimmung der Inhibitorkonstanten und des Hemmtyps

4.2.1. Hinreaktion

Zur Bestimmung der Inhibitorkonstanten K_I, der Dissoziationskonstanten des Enzym-Inhibitor-Komplexes, sind verschiedene Verfahren beschrieben worden.

Die Auswertung der kinetischen Daten mittels eines Dixon-Diagrammes erschien nur sinnvoll, wenn zum einen die Hemmung kompetitiv, zum anderen der gemeinsame Schnittpunkt der Geraden nicht allzu weit von der y-Achse entfernt lag, da sonst dessen Konstruktion und damit die Bestimmung der K_I mit großen Ungenauigkeiten verbunden ist.

In allen anderen Fällen wurde die Auswertung von Sekundärdiagrammen vorgezogen, da sie - was beim Dixon-Diagramm schwierig ist - eine Auswertung mittels statistischer Methoden (Lineare Regression) ermöglicht und darüber hinaus, im Falle der nicht kompetitiven Hemmung, mehr Informationen vermittelt.

Glyphosat hemmte die Aktivität der EPSP-Synthase aus A. aerogenes 62-1 kompetitiv hinsichtlich PEP (Abb.62) und nicht kompetitiv hinsichtlich S-3-P (Abb.63).

Die Inhibitorkonstante K_I wurde - bezogen auf PEP - mit 1 µM ermittelt (Abb. 64). Mit S-3-P als variablem Substrat ist, da der gemeinsame Schnittpunkt in der Lineweaver-Burk-Darstellung auf der x-Achse liegt, $K_I = K_{II}$ und beträgt 0.22 mM (Abb. 65).

Da die Hemmung bezüglich PEP kompetitiv ist, ist dieser Wert jedoch von der PEP-Konzentration abhängig und somit wenig aussagekräftig.

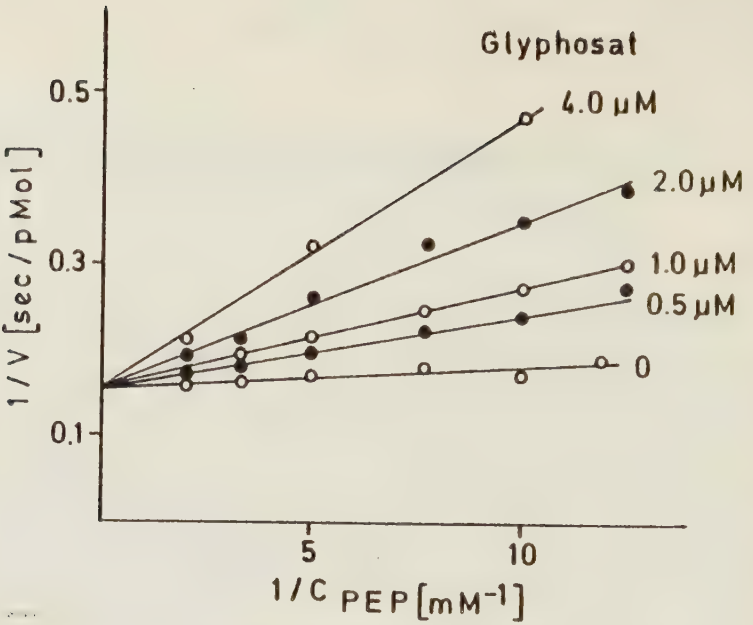


Abb. 62: Lineweaver-Burk-Diagramm der Hemmung der Hinreaktion durch Glyphosat mit PEP als variiertem Substrat (S-3-P=5 mM)

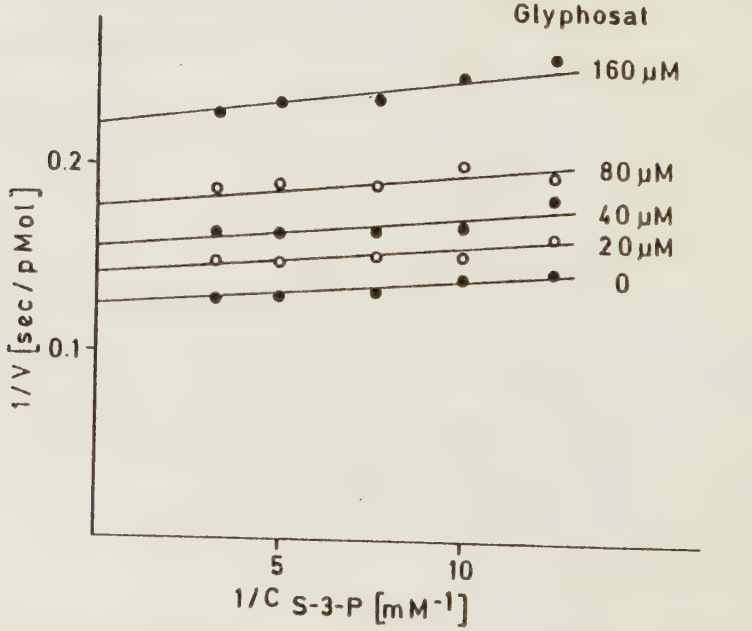


Abb. 63: Lineweaver-Burk-Diagramm der Hemmung der Hinreaktion durch Glyphosat mit S-3-P als variiertem Substrat (PEP= 5 mM)

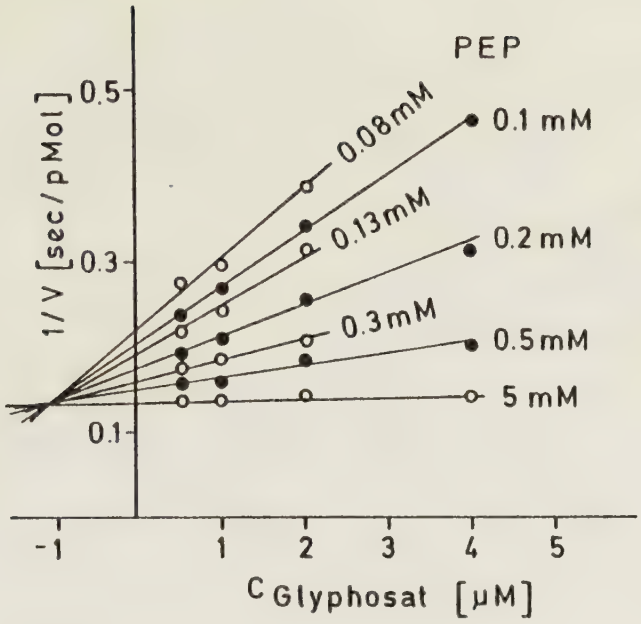


Abb. 64 : Dixon-Diagramm der Hemmung der Hinreaktion durch Glyphosat mit PEP als variiertem Substrat (S-3-P = 5 mM)

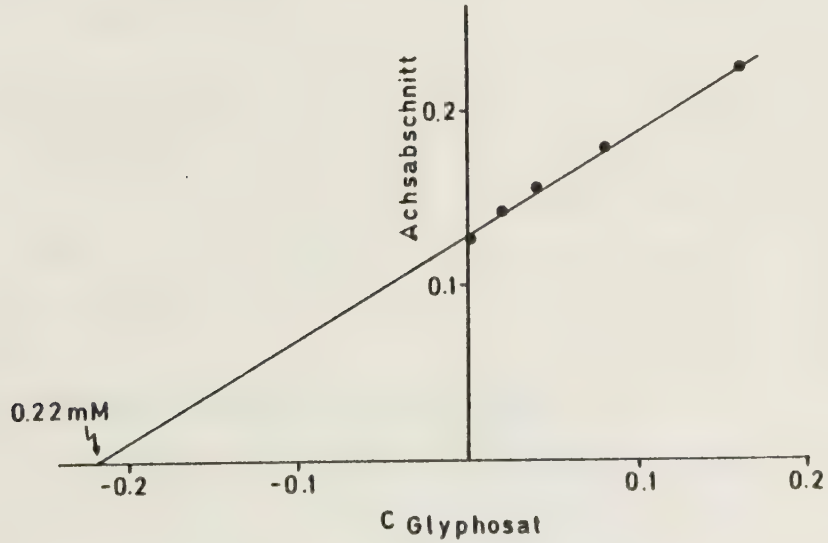


Abb. 65 : Sekundärdiagramm zu Abb. 63 . Abhängigkeit des y-Achsenabschnittes der in Abb. 63 erhaltenen Geraden von der Glyphosatkonzentration

4.2.2. Rückreaktion

Die Hemmung der Rückreaktion durch Glyphosat war bezüglich beider Substrate, EPSP und P_i, nicht kompetitiv (Abb. 66, Abb. 67).

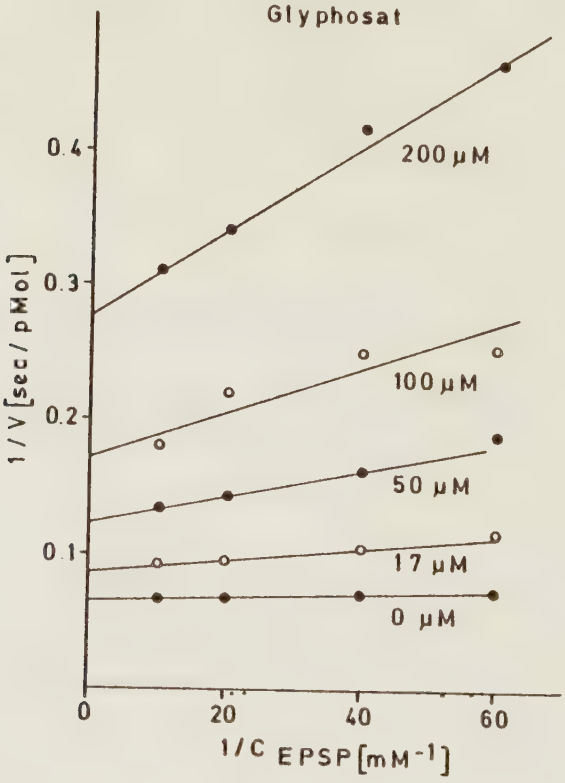


Abb. 66 : Lineweaver-Burk-Diagramm der Hemmung der EPSP-Synthase (Rückreaktion) durch Glyphosat mit EPSP als variiertem Substrat

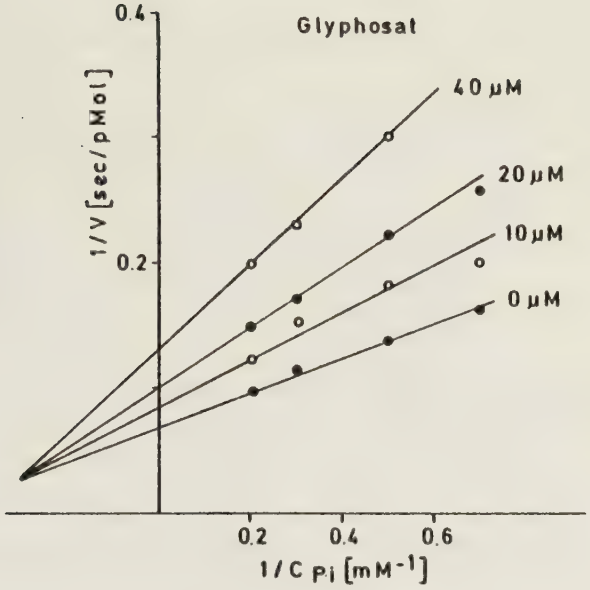


Abb. 67: Lineweaver-Burk-Diagramm der Hemmung der EPSP-Synthase (Rückreaktion) durch Glyphosat mit Phosphat als variiertem Substrat

Da die Schnittpunkte in der Lineweaver-Burk-Darstellung zwischen der x- und der y-Achse lagen , konnten jeweils zwei Inhibitorkonstanten ermittelt werden. Aus den Sekundärdiagrammen (Abb. 68, Abb. 69) ergab sich :

K_I = 8 µM (EPSP variables Substrat, Abb. 68)

K_{II} = 63 µM (EPSP variables Substrat, Abb. 68)

K_I = 27 µM (P_i variables Substrat, Abb. 69)

K_{II} = 49 µM (P_i variables Substrat, Abb. 69)

Die hier ermittelten K_I-Werte sind deutlich größer als die Dissoziationskonstante für den Glyphosat-Enzym-Komplex, d.h. die K_I mit PEP als variablem Substrat.

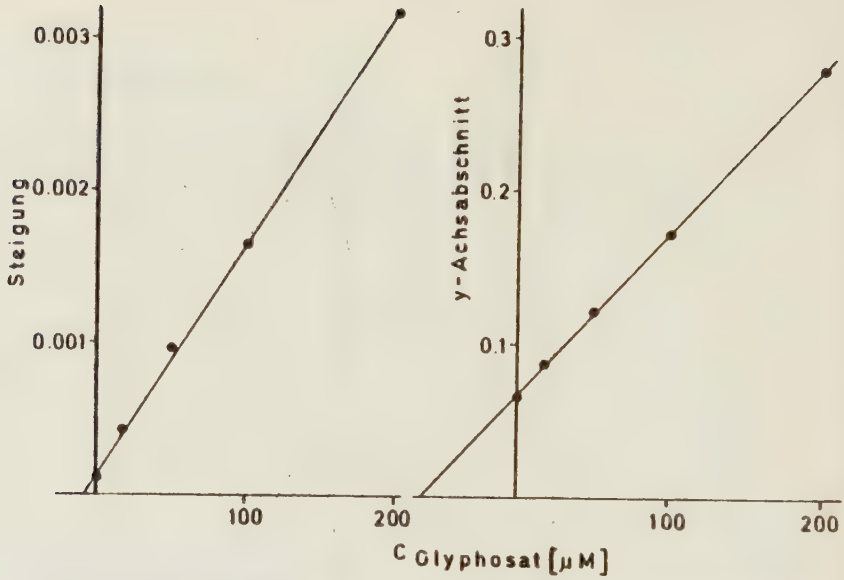


Abb. 68: Sekundärdiagramme zu Abb. 66. Abhängigkeit der Steigung bzw. des y-Achsenabschnittes der in Abb. 66 erhaltenen Geraden von der Glyphosatkonzentration

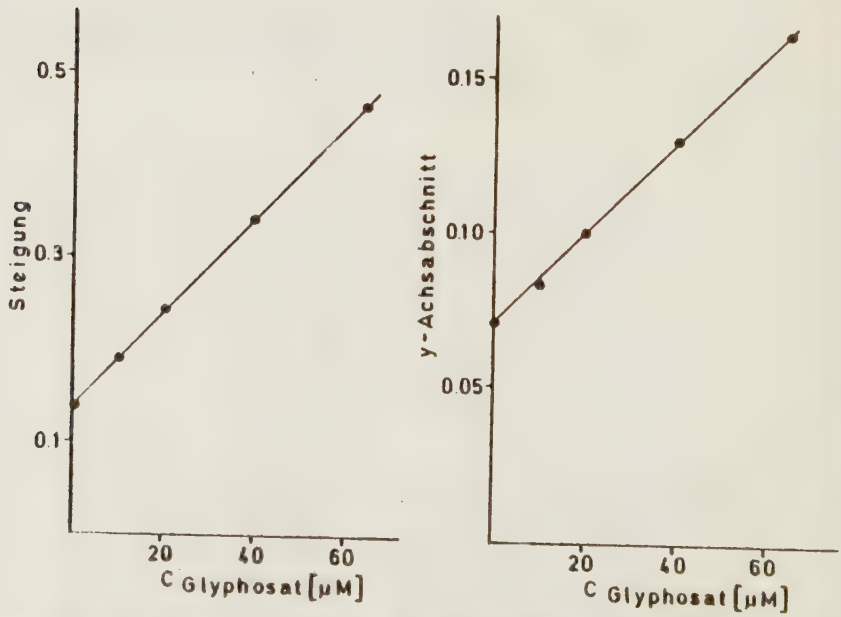


Abb. 69: Sekundärdiagramme zu Abb. 67. Abhängigkeit der Steigung bzw. des y-Achsenabschnittes der in Abb. 67 erhaltenen Geraden von der Glyphosatkonzentration

4.3. Einfluß des pH-Wertes auf die Hemmung durch Glyphosat

Da an der Bindung von Substraten und Inhibitoren an das Enzym geladene Gruppen beteiligt sein können und der Ladungszustand dieser Gruppen vom pH-Wert abhängt, kann eine Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes auf die Hemmung der EPSP-Synthase-Aktivität durch Glyphosat möglicherweise Aufschluß darüber geben, welche Gruppen, insbesondere auf Seiten des Enzyms, an der Bindung des Inhibitors beteiligt sind.

Die pH-Abhängigkeit der Hemmung der EPSP-Synthase-Aktivität durch Glyphosat wurde in 10 mM Tris/Maleinsäure/NaOH-Puffer untersucht. Der pH-Wert wurde jeweils direkt in einem Parallelansatz mit einer Mikroelektrode gemessen.

Wie Abb.70 zeigt, hatte der pH-Wert einen starken Einfluß auf die hemmende Wirkung von Glyphosat, sie nahm mit dem pH-Wert drastisch zu.

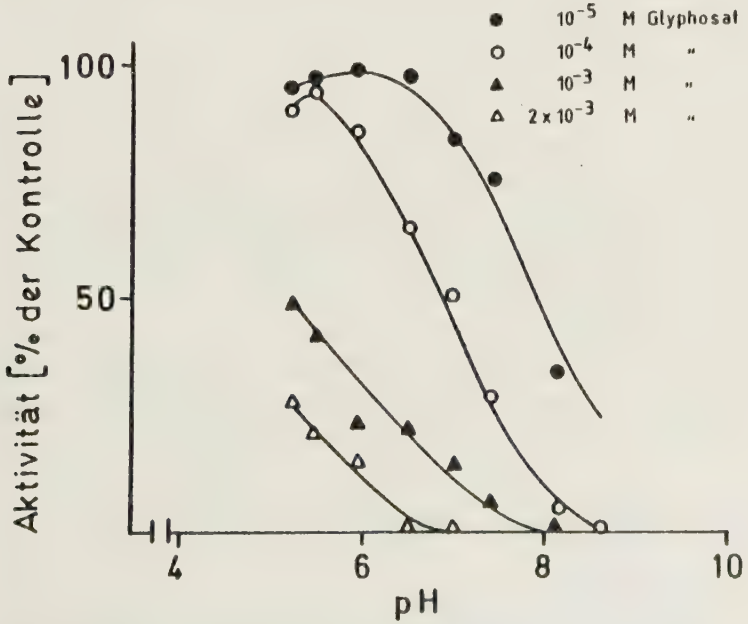


Abb. 70 : Einfluß des pH-Wertes auf die Hemmung der EPSP-Synthase durch Glyphosat

Eine Möglichkeit der Erklärung wäre, daß eine schwache Säure an der Enzym-Inhibitor-Wechselwirkung beteiligt ist, deren konjugierte Base einen wesentlichen Teil zur Bindung des Herbizids beiträgt.

4.4. Einfluß von Glyphosin, Aminomethylphosphonsäure und Iminodiessigsäure

Von den drei Verbindungen Glyphosin, Aminomethylphosphonsäure und Iminodiessigsäure, die große strukturelle Verwandtschaft zu Glyphosat besitzen (Formeln siehe III.1.1.) hat keine herbizide Aktivität. Glyphosin, das im Zuckerrohranbau zur Erhöhung des Zuckergehaltes eingesetzt wird, kann jedoch in Pflanzen Chlorosen hervorrufen (CROFT et al., 1974).

Keine dieser drei Verbindungen hemmte in 1 mMolarer Konzentration die EPSP-Synthase.

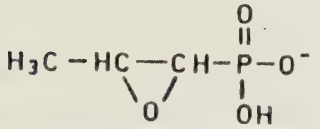
4.5. Einfluß von 1-Hydroxycyclopropancarbonsäurephosphat (HCP)

HCP hemmt als PEP-analoge Verbindung sehr empfindlich eine Reihe PEP-umsetzender Enzyme. Die Inhibitorkonstanten für die PEP-Carboxylase und die Enolase liegen im mikromolaren Bereich (7.3 µM bzw. 8.0 µM); diejenige für die Pyruvat-Kinase wurde mit 2.0 mM bestimmt (O'LEARY et al., 1981).

Die Aktivität der EPSP-Synthase wurde von 1 mM HCP lediglich auf 91% der Kontrolle ohne Inhibitor reduziert.

4.6. Einfluß von Fosfomycin

Fosfomycin (Abb. 71) ist ein irreversibler Inhibitor des zweiten bekannten Enzyms, das einen intakten Enolpyruvoylrest überträgt, der Enoylpyruvat-Transferase. Es wirkt jedoch nur in Anwesenheit des zuerst gebundenen Substrates dieses Enzyms, UDP-N-Acetylglucosamin (ANWAR et al., 1971; CASSIDY u. KAHAN, 1973).



Fosfomycin

Abb. 71 : Strukturformel von Fosfomycin

Die EPSP-Synthase wurde durch 1 mM Fosfomycin in An- oder Abwesenheit je eines der beiden Substrate weder gehemmt noch - innerhalb von 90 min - inaktiviert.

4.7. Einfluß der aromatischen Aminosäuren

Die Aktivitäten einiger Enzyme des Shikimisäureweges sind in Bakterien einer Feedback-Kontrolle unterworfen, d.h. sie sind abhängig von der Konzentration einer oder mehrerer der drei aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan, die Endprodukte des Shikimisäureweges sind.

Hierzu gehören in der Regel die Enzyme, die am Anfang und an den Verzweigungsstellen des Stoffwechselweges liegen; so die DAHP-Synthase , Prephenat-Dehydrogenase, Anthranilat-Synthase und Chorismat-Mutase (Oberblick siehe HASLAM, 1974).

Die EPSP-Synthase wurde in vitro durch keine der drei aromatischen Aminosäuren in 1 mMolarer Konzentration in ihrer Aktivität beeinflußt.

5. Inaktivierungsversuche

Eine Möglichkeit, Aufschluß über die an der Substratbindung beteiligten Aminosäuren bzw. deren Seitenketten zu erhalten, besteht darin, diese Seitenketten mit Hilfe spezifischer Reagenzien so zu modifizieren, daß die Enzymaktivität eingeschränkt oder völlig eingebüßt wird. Läßt sich die Inaktivierungsgeschwindigkeit durch Zugabe von Substraten, Inhibitoren oder strukturverwandten Verbindungen, die an das aktive Zentrum binden und so dort befindliche Aminosäureseitenketten vor der Modifizierung schützen, herabsetzen, ist es wahrscheinlich, wenn auch nicht völlig sicher, daß sich eine mit diesem Reagenz modifizierbare Aminosäure im aktiven Zentrum befindet.

Da es jedoch nur wenige Reagenzien gibt, die unter physiologischen Bedingungen eine genügend hohe Gruppenspezifität besitzen (siehe MEANS u. FEENEY, 1971), sollte zur Absicherung der Ergebnisse ein Vergleich der Aminosäurenzusammensetzung eines Proteins vor und nach der Modifizierung erfolgen.

Da dies im vorliegenden Fall aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Proteinmenge nicht möglich war, können die Ergebnisse lediglich als Anhaltspunkt dienen.

Die EPSP-Synthase wurde mit verschiedenen gruppenspezifischen Reagenzien versetzt und die Inaktivierungsgeschwindigkeit in An- und Abwesenheit von Produkten, Substraten etc. in jeweils 1 mMolarer Konzentration gemessen, indem zu unterschiedlichen Zeiten aus dem bei $30^{o}C$ aufbewahrten Inkubationsansatz 10 µl entnommen und in einem normalen Testansatz eingesetzt wurden. Es wurde jeweils eine Kontrolle ohne gruppenspezifisches Reagenz durchgeführt, um einen Einfluß der Substrate etc. auf die Stabilität des Enzyms auszuschließen.

5.1. Phenylglyoxal

Bei einer ganzen Reihe von Enzymen, die negativ geladene Substrate umsetzen, konnten im aktiven Zentrum Argininreste nachgewiesen werden, dessen Guanidinogruppe ein idealer Partner für Wechselwirkungen mit Phosphat- oder Carboxylgruppen enthaltenden Substraten darstellt (SCHNEIDER, 1978).

Phenylglyoxal reagiert unter physiologischen Bedingungen bevorzugt mit Argininresten unter Bildung eines Produktes, das zwei Phenylglyoxalmoleküle pro Guanidinogruppe enthält. In geringem Maße können auch Aminogruppen modifiziert werden (TAKAHASHI, 1968; TAKAHASHI, 1977).

Ein weiteres Reagenz, das weitaus selektiver Argininreste modifiziert als Phenylglyoxal, 1,2-Cyclohexandion, konnte nicht verwendet werden, da es seine Reaktionsfähigkeit und seine Spezifität erst im stark alkalischen Milieu entfaltet (TOI et al., 1967). Unter diesen Bedingungen war die EPSP-Synthase jedoch nicht mehr stabil.

Phenylglyoxal inaktivierte die EPSP-Synthase nach einem Zeitgesetz 1. Ordnung (Abb. 72).

Während P_i und Shikimisäure keinen Einfluß auf die Inaktivierungsgeschwindigkeit hatten, wurde diese durch die anderen Substrate oder Produkte und durch Glyphosat deutlich herabgesetzt; mit steigender Wirksamkeit in der Reihenfolge PEP, S-3-P, Glyphosat und EPSP.

Es kann daher angenommen weden, daß zum einen Phenylglyoxal einen Aminosäurerest oder mehrere -reste im aktiven Zentrum modifiziert, zum anderen, daß diese vier Verbindungen allein, d.h. ohne Zugabe eines Kosubstrates, an das aktive Zentrum gebunden werden können.

Da Phenylglyoxal mit zwei verschiedenen Aminosäureresten, nämlich sowohl Guanidino- als auch Aminogruppen reagieren kann und darüber hinaus die jeweilige Reaktionsfähigkeit dieser Gruppen von ihrer direkten Umgebung abhängen dürfte, erscheint eine quantitative Interpretation, wie etwa ein Vergleich von Halbwertszeiten der Inaktivierung und

Substratbindungskonstanten , schwierig.
Sowohl PEP als auch S-3-P verlangsamten die Inaktivierungsgeschwindigkeit; daher sollten an der Bindung der beiden Substrate Guanidino- oder auch Aminogruppen beteiligt sein. Damit stimmt überein, daß EPSP, das ja das vollständige Kohlenstoffgerüst beider Verbindungen enthält, weitaus am effektivsten die Inaktivierungsrate herabsetzte.

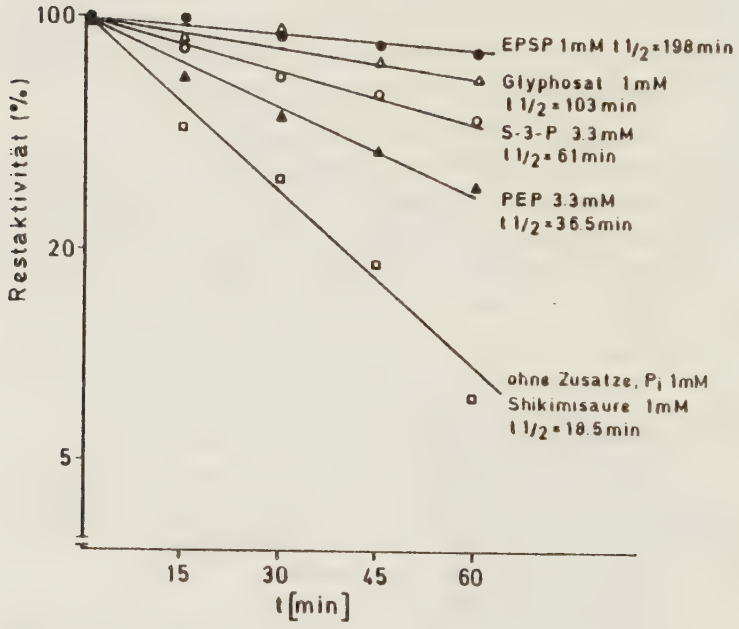


Abb. 72: Einfluß verschiedener Verbindungen auf die Inaktivierung der EPSP-Synthase durch Phenylglyoxal

5.2. 3-Brompyruvat

3-Brompyruvat inaktiviert irreversibel eine Reihe von Enzymen, die Pyruvat oder PEP umsetzen, so beispielsweise die Pyruvat-Carboxylase (GALE, 1971), die Pyruvat-Kinase (YUN u. SUELTER, 1979), die DAHP-Synthase (STAUB u. DENES, 1969) und die 2-Keto-3-deoxy-6-Phosphogluconat-Aldolase (MELOCHE, 1965). Es reagiert im wesentlichen mit freien SH-Gruppen im aktiven Zentrum dieser Enzyme.

Auch die an der bakteriellen Zellwandsynthese beteiligte Enoylpyruvat-Transferase, die Pyruvat nicht am aktiven Zentrum bindet, wird durch 3-Brompyruvat inaktiviert, allerdings im wesentlichen nur in Gegenwart des zuerst gebundenen Substrates UDP-N-Acetylglucosamin (ANWAR u. VLAOVIC, 1980).

3-Brompyruvat inaktivierte die EPSP-Synthase nach einem Zeitgesetz 1. Ordnung (Abb. 73).

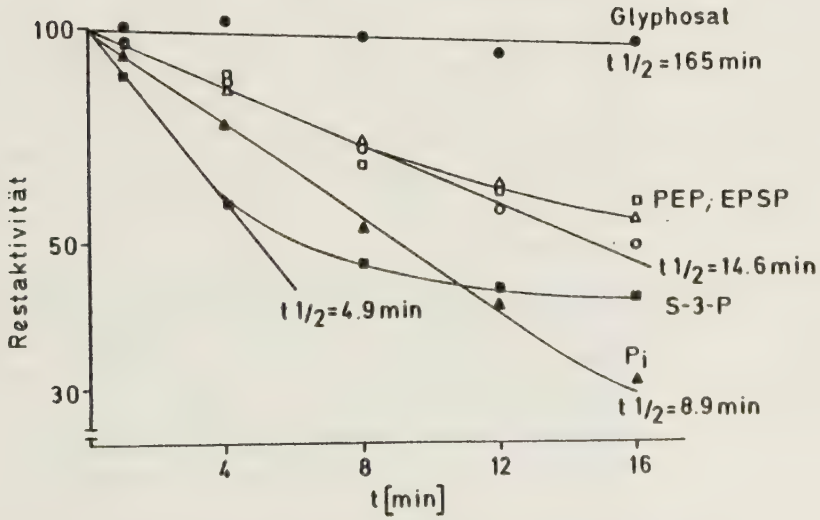


Abb. 73 : Einfluß verschiedener Verbindungen auf die Inaktivierung der EPSP-Synthase durch 3-Brompyruvat

Während PEP und EPSP keinen Einfluß auf die Inaktivierungsgeschwindigkeit hatten, wurde diese durch P_i und in stärkerem Maße durch S-3-P gesteigert.

Es muß daher angenommen werden, daß durch die Anlagerung von S-3-P oder P_i das Enzym und damit dessen Affinität zu 3-Brompyruvat verändert wird. Glyphosat hemmte die Inaktivierung fast vollständig, wohingegen die strukturähnlichen Verbindungen Glyphosin, Aminomethylphosphonsäure und Iminodiessigsäure nicht wirksam waren.

In Anwesenheit von S-3-P war der Logarithmus der Restaktivität nur ca. 4 min proportional zur Zeit; danach schien er einem Grenzwert zuzustreben, der bei ca. 40% Restaktivität lag.

5.3. N-Ethyl-Maleimid (NEM)

NEM reagiert mit freien SH-Gruppen unter Bildung eines Additionsproduktes. Primäre Aminogruppen können in der gleichen Weise reagieren. Beide Reaktionen sind pH-abhängig, bei pH 7 werden jedoch SH-Gruppen ca. 1000fach schneller als Aminogruppen umgesetzt (MARRIAN, 1949; SMYTH, 1960).

Die Inaktivierung der EPSP-Synthase durch 2 mM NEM folgte nicht einem Zeitgesetz 1. Ordnung (Abb. 74). Die Restaktivität strebte jeweils Grenzwerten zu, die von 0 verschieden und für nahezu jede hinzugegebene Komponente anders waren.

betrachtet man nur die ersten 4 min, so fällt auf, daß P_i als einzige der untersuchten Verbindungen die Inaktivierungsgeschwindigkeit heraufsetzte. S-3-P hatte keinen oder nur einen sehr geringen Einfluß, während PEP und EPSP deutlich die Inaktivierung verlangsamten. Glyphosat verhinderte die Inaktivierung fast vollständig.

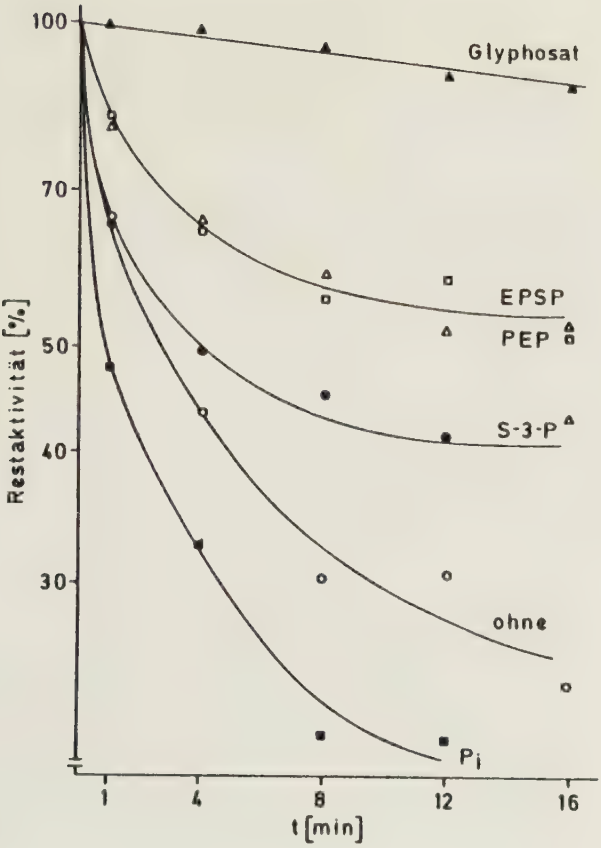


Abb. 74 : Einfluß verschiedener Verbindungen auf die Inaktivierung der EPSP-Synthase durch N-Ethyl-Maleimid

IV. Diskussion

1. Überlegungen zu den Ergebnissen dieser Arbeit

Schon 1972 stellt JAWORSKI auf der Grundlage seiner Wachstumsversuche mit Rhizobium japonicum und Lemna gibba die Hypothese auf, Glyphosat hemme eine Enzym des Shikimisäureweges, und die herbizide Wirkung dieser Verbindung beruhe auf einer Unterbrechung der Versorgung der Pflanzen mit aromatischen Aminosäuren.
Inzwischen wurde der Einfluß des Herbizids auf nahezu alle Enzyme dieses Biosyntheseweges in vitro untersucht.

In sehr hohen Konzentrationen ($\leq$ 10 mM) konnten die Aktivität der DAHP-Synthase, der 5-Dehydrochinat-Synthase und der Anthranilat-Synthase aus E. coli herabgesetzt werden; jedoch war die Hemmung durch erhöhte Zugabe der Kofaktoren Co^{2+} bzw. Mg^{2+} aufhebbar (ROISCH u. LINGENS, 1974; ROISCH u. LINGENS, 1980), so daß dieser Effekt wohl auf die Metallionen-chelierenden Eigenschaften von Phosphonsäuren (CARTER et al., 1967) und nicht auf eine direkte Enzym-Herbizid-Wechselwirkung zurückzuführen sein dürfte. Es wurden von diesen Autoren auch keine Kontrollexperimente mit nicht-herbiziden Strukturanalogen durchgeführt. Shikimat-Dehydrogenase aus Glycine max L. (DUKE u. HOAGLAND, 1981), Chorismat-Mutase, Prephenat-Dehydrogenase und Prephenat-Dehydratase aus E. coli (ROISCH u. LINGENS, 1974; ROISCH u. LINGENS, 1980) wurden nicht beeinflußt.

Von der Sequenz Shikimisäure → Anthranilsäure wurde in Rohextrakten aus A. aerogenes 62-1 durch 1 mM Glyphosat nur die EPSP-Synthase in ihrer Aktivität herabgesetzt; deren Hemmung war schon in sehr geringen Herbizid-Konzentrationen stark ausgeprägt. Shikimat-Kinase, Chorismat-Synthase und Anthranilat-Synthase wurden nicht beeinflußt.

Zumindest in Bakterien scheint daher die EPSP-Synthase das einzige Enzym des Shikimisäureweges zu sein, dessen Empfindlichkeit in vitro für Glyphosat hoch genug ist, um möglicherweise der Grund für die in vivo beobachtete Wachstumshemmung sein zu können.

LEIFELD (1982) konnte inzwischen zeigen, daß die aus der Zellkultur einer höheren Pflanze, Corydalis sempervirens, angereicherte EPSP-Synthase ähnlich sensibel auf Glyphosat reagiert wie das bakterielle Enzym.

Unter 20 verschiedenen Pflanzenspezies, einschließlich der Grünalge Chlamydomonas reinhardtii, in denen EPSP-Synthase-Aktivität nachgewiesen werden konnte, war keine, deren EPSP-Synthase nicht durch Glyphosat empfindlich hemmbar war (AMRHEIN, pers. Mitteilung). Es ist daher anzunehmen, daß die Hemmbarkeit durch Glyphosat eine generelle Eigenschaft der EPSP-Synthase auch aus höheren Pflanzen sein dürfte.

Um eine genaue Untersuchung der Enzym-Inhibitor-Wechselwirkung zu ermöglichen, wurde die EPSP-Synthase aus A. aerogenes 62-1 ca. 3000fach bis nahezu zur Homogenität angereichert. Von den verwendeten Verfahren wurden nur die Ammoniumsulfatfällung (LEVIN u. SPRINSON, 1964) und die DEAE-Cellulose-Chromatographie (BONDINELL et al., 1971) schon einmal zur Anreicherung der EPSP-Synthase aus Bakterien eingesetzt.

LEIFELD (1982) konnte die EPSP-Synthase aus Corydalis sempervirens Zellkulturen durch Ammoniumsulfatfällung, DEAE-Cellulose-Chromatographie und Ausschluß-Chromatographie an Ultrogel ACA 34 223fach, BODE und BIRNBAUM (1981 a) das Enzym aus der Hefe Hansnula henricii mit ähnlichen Reinigungsverfahren 62fach anreichern.

Interessant erscheint die Bindung der EPSP-Synthase an Cellulose-Phosphat bei pH 6.0, da der isoelektrische Punkt des Enzyms bei pH 4.6 liegt, und es daher nicht aufgrund seiner Molekülladung an den Ionenaustauscher gebunden werden kann.

Da alle an der von der EPSP-Synthase katalysierten Reaktion beteiligten Verbindungen einen Phosphatrest enthalten, sollte es sich hierbei um eine Art Affinitätschromatographie handeln. Das gleiche Verfahren wurde u.a. bereits zur Reinigung der Tryptophan-sensitiven DAHP-Synthase aus Neurospora crassa (NIMMO u. COGGINS, 1981), des arom-Multienzymkomplexes aus Neurospora crassa (COLE u. GAERTNER, 1975; LUMSDEN u. COGGINS, 1977) und der Chorismat-Synthase aus Bacillus subtilis (HASAN u. NESTER, 1978), die ebenfalls phosphorylierte Substrate umsetzen, angewendet.

Die Chromatofokussierung ist eine noch recht neue und bisher kaum verwendete Methode. Bei etwa gleichem Separationsverhalten bietet sie gegenüber der isolektrischen Fokussierung einige Vorteile (siehe SLUYTERMAN u. WIJDENES, 1978; SLUYTERMAN u. ELGERSMA, 1978). Insbesondere war die Dauer des Verfahrens - bis zur Elution der EPSP-Synthase ca. 2 1/2 h - wegen der Instabilität des Enzyms bei niedrigem pH-Wert ein wesentlicher Gesichtspunkt. Ein wichtiges Zufallsergebnis war darüber hinaus die hohe Stabilität des Enzyms in dem bei diesem Trennungsverfahren verwendeten Ampholyten (Polybuffer), die in keinem anderen Medium erreicht werden konnte.

Für mehrere Enzyme des Shikimisäureweges, so z.B. für die DAHP-Synthase, die Shikimat-Kinase und die Chorismat-Mutase wurden in verschiedenen Organismen multiple Enzymformen beschrieben (siehe HASLAM, 1974). Da in keinem einzigen Trennungsschritt, einschließlich der Elektrophorese unter nicht denaturierenden Bedingungen, ein Hinweis auf voneinander trennbare EPSP-Synthase-Aktivitäten gefunden werden konnten, muß davon ausgegangen werden, daß in A. aerogenes 62-1 nur eine einzige Form dieses Enzyms vorhanden ist.

Bisher wurden nur in Bacillus subtilis multiple Enzymformen der EPSP-Synthase beschrieben, die sich im Molekulargewicht unterschieden. Nach Saccharose-Dichte-

gradienten-Zentrifugation ließen sich drei Maxima erkennen, von denen zwei möglicherweise verschiedene Aggregatzustände der gleichen Untereinheit darstellten (BERLYN u. GILES, 1969). In allen anderen Fällen konnten keine Isoenzyme der EPSP-Synthase gefunden werden (BERLYN et al., 1970; KOSHIBA, 1979; BODE u. BIRNBAUM, 1981 a; BODE u. BIRNBAUM, 1981 b; LEIFELD, 1982), jedoch wurden in den meisten Fällen nur sehr wenige Trennungsmethoden angewendet.

Eine ganze Reihe von Untersuchungen liegt über das Molekulargewicht der EPSP-Synthase vor, das meistens mit Hilfe der Dichtegradienten-Zentrifugation bestimmt wurde, da nach der Entdeckung des Arom-"Komplexes" in Neurospora crassa und anderen Pilzen (GILES et al., 1967; AHMED u. GILES, 1969), in denen alle Enzymaktivitäten zwischen Dehydrochinasäure-Synthase und EPSP-Synthase (beide einschließlich) in einem Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 230000 D vereinigt sind, viele Organismen auf die Trennbarkeit dieser Enzyme untersucht wurden (BERLYN u. GILES, 1969; BERLYN et al., 1970; BODE u. BIRNBAUM, 1981 b). Die von diesen Autoren für die EPSP-Synthase bestimmten Molekulargewichte liegen zwischen 33000 D und 78000 D.

Für die EPSP-Synthase aus A. aerogenes 62-1 wurden mit zwei Verfahren sehr unterschiedliche Molekulargewichte ermittelt: 32400 D mit der Gelchromatographie und 42900 D mit der SDS-Gelelektrophorese. BERLYN und GILES (1969) fanden mit einem Saccharose-Dichtegradienten für das Enzym aus A. aerogenes NCW (Wildtyp) ein Molekulargewicht von 35000 D. Da das mit der SDS-Gelelektrophorese ermittelte Molekulargewicht eher größer ist als das mit der Gelchromatographie erhaltene, kann auf jeden Fall davon ausgegangen werden, daß die EPSP-Synthase nur aus einer Peptidkette besteht.

Interessanterweise wurde eine ähnliche Differenz zwischen den mit Gelchromatographie und SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese ermittelten Molekulargewichten auch bei der Untersuchung der Enoylpyruvat-Transferase, dem einzigen noch bekannten Enzym, das ebenfalls einen intakten Enolpyruvoylrest überträgt, gefunden (ZEMELL u. ANWAR, 1975).

Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes ergab sowohl mit der isoelektrischen Fokussierung als auch mit der Chromatofokussierung einen Wert von pH 4.6 .

Eine Beteiligung von Metallionen an der EPSP-Synthase-Reaktion kann wohl ausgeschlossen werden, da weder nach Zugabe von Metallionen eine Aktivierung , noch nach Behandlung mit Komplexbildnern eine Inaktivierung beobachtet werden konnte. Zum gleichen Ergebnis gelangten LEVIN und SPRINSON (1964) bei der Untersuchung des Enzyms aus E. coli.

Die beobachtete Stabilisierung der Enzymaktivität durch EDTA läßt auf Schwermetall-empfindliche Strukturen schließen, was sich durch die Inaktivierung nach Zugabe von Schwemetallionen belegen läßt. Da die Inaktivierung in erster Näherung mit der Abnahme des Löslichkeitsproduktes der Metallsulfide zunimmt, kann vermutet werden, daß es sich u.a. um eine oder mehrere für die Aufrechterhaltung der Enzymaktivität notwendige SH-Gruppe(n) handelt.

Gestützt wird diese Vermutung noch durch die Stabilisierungsversuche mit SH-Gruppen enthaltenden Chemikalien, aus denen hervorgeht, daß die Anwesenheit ganz bestimmter SH-Chemikalien, z.B. Cystein, optimale Stabilität gewährleistet. Die Empfindlichkeit gegenüber starken Reduktionsmitteln wie DTE und DTT zeigt jedoch, daß auch reduktionsempfindliche Gruppen, z.B. S-S-Gruppen, vorhanden sein müssen.

Der Einfluß der Temperatur auf die Aktivität eines Enzyms kann in einer ganzen Reihe unterschiedlicher Vorgänge begründet sein (siehe DIXON u. WEBB, 1964; p.145 ff.). Unter der Voraussetzung,daß der Anteil der übrigen Energiebeiträge gegenüber der Aktivierungsenergie zu vernachlässigen ist, kann aus einer graphischen Darstellung ln(v) gegen 1/T die Aktivierungsenergie abgeschätzt werden (BISSWANGER, 1979; p. 127). Eine weitere Voraussetzung hierfür, die Substratsättigung des Enzyms, ist bei Mehrsubstratreaktionen nur schwierig zu erfüllen; es kann daher nur von einer Abschätzung der Aktivierungsenergie gesprochen werden. Die ermittelten Werte, 54.2 kJ/Mol für die Hin- und 64.1 kJ/Mol für die Rückreaktion bewegen sich im "Normbereich" für enzymatisch katalysierte Reaktionen (BISSWANGER, 1979). LEIFELD (1982) fand für die EPSP-Synthase aus Corydalis sempervirens Zellkulturen (Hinreaktion) 51.8 kJ/Mol.

Die zweigipflige Form des pH-Optimums findet sich auch bei der Hinreaktion der EPSP-Synthase aus Corydalis sempervirens Zellkulturen, jedoch gegenüber derjenigen aus A. aerogenes 62-1 um eine pH-Einheit in den alkalischen Bereich verschoben (LEIFELD, 1982). In beiden Fällen wurde eine deutliche Abhängigkeit der Enzymaktivität im Bereich der Maxima von der Art des verwendeten Puffers beobachtet.

Die EPSP-Synthase aus E. coli (LEVIN u. SPRINSON, 1964) und Hansenula henricii (BODE u. BIRNBAUM, 1981 a) dagegen scheinen für die Hinreaktion nur ein Aktivitätsmaximum bei pH 5.8 bzw. 5.5 zu besitzen. Beide Darstellungen beruhen jedoch auf Daten, die mit Substratkonzentrationen von 1 mM oder darunter ermittelt wurden, wohingegen die zweigipfligen pH-Optima für die Hinreaktion mit 5 mM Substratkonzentration ermittelt wurden. So könnte diese Differenz möglicherweise lediglich auf unterschiedliche Substratkonzentrationen in den Bestimmungsansätzen zurückzuführen sein, da auch die EPSP-Synthase aus A. aerogenes 62-1

bei niedriger Substratkonzentration (je 0.2 mM) nur ein Maximum bei pH 6.0 aufweist, und sowohl in der Lage des Maximums als auch im Hinblick auf den moderaten Abfall der Enzymaktivität bei größer werdendem pH-Wert große Ähnlichkeit mit den Eigenschaften des Enzyms aus E. coli aufweist.

Es ist nicht unerwartet, daß die Substratkonzentration einen Einfluß auf die Form des pH-Optimums hat, da - wenn auch eine irreversible Inaktivierung des Enzyms ausgeschlossen werden kann - immer noch wenigstens zwei Faktoren sich mit dem pH-Wert ändern können: die Affinität der Substrate zum Enzym (K_M) und die Umsetzungskonstante $K_{cat.}$. Zusätzlich muß im Falle der EPSP-Synthase noch die Art und Konzentration des verwendeten Puffers berücksichtigt werden, deren Einfluß - zumindest bei der EPSP-Synthase aus A. aerogenes 62-1 - mit abnehmender Konzentration der Substrate wächst.

Die Ermittlung der pH-Abhängigkeit von $K_{cat.}$ und der Substratbindungskonstanten scheint aber für Reaktionen mit zwei Substraten umständlich, insbesondere dann, wenn wie bei der EPSP-Synthase aus A. aerogenes 62-1 nur partiell lineare Lineweaver-Burk-Diagramme erhalten werden konnten.

Bemerkenswert scheint der Einfluß von Ionen auf die EPSP-Synthase zu sein. Während bei niedrigen Substratkonzentrationen je nach der Konzentration der Ionen ein aktivierender oder ein inaktivierender Einfluß der Salze auf das Enzym beobachtet werden konnte, wurde bei hohen Substratkonzentrationen nur eine Herabsetzung der Enzymaktivität durch die Ionen festgestellt. Da unterschiedliche Kationen bei jeweils dem gleichen Anion die gleichen; unterschiedliche Anionen bei jeweils dem gleichen Kation aber unterschiedliche Konzentrationsabhängigkeiten der Enzymaktivität zur Folge hatten, muß geschlossen werden, daß die Anionen die wirksame Komponente darstellen. Da ein aktivierender Einfluß von Anionen bei niedriger Substratkonzentration gut, in

hohen Substratkonzentrationen jedoch nicht mehr festzustellen ist, sollten die Substrate, die ja auch Anionen sind, ebenfalls einen aktivierenden Einfluß ausüben.

Es ist daher anzunehmen, daß außer dem aktiven Zentrum noch weitere Bindungsstellen am Enzym existieren, bei deren Besetzung durch Anionen die Aktivität der EPSP-Synthase erhöht wird, und die sowohl von den Substraten als auch von anderen Anionen besetzt werden können.

Andererseits ist gut vorstellbar, daß zusätzlich in großen Mengen vorhandene Anionen mit den Substraten um das aktive Zentrum des Enzyms konkurrieren, d.h. kompetitiv hemmen. Dafür spricht, daß die Hemmung der Enzymaktivität durch Anionen bei niedrigen Substratkonzentrationen wesentlich stärker ausfällt als bei hohen. Eine quantitative Untersuchung dieses Vorgangs wurde jedoch nicht vorgenommen.

Eine durch Anlagerung der Anionen an das Enzym bedingte Verschiebung einer Flanke oder beider Flanken des pH-Optimums zu alkalischeren pH-Werten, wie etwa bei der Amylase (MYRBÄCK, 1926) oder der Fumarase (MASSEY, 1953) konnte bei der EPSP-Synthase zumindest nicht in dieser Intensität beobachtet werden, jedoch änderte sich die Form des pH-Optimums geringfügig durch Zugabe von Anionen. Im wesentlichen konnte nur ein Einfluß auf die Höhe des Maximums beobachtet werden.

Untersuchungen zur Bestimmung der Substratbindungskonstanten und der Reihenfolge der Bindung der Substrate an die EPSP-Synthase liegen bisher kaum vor. In einigen wenigen Fällen wurde die apparente K_M für beide Substrate in der Hinreaktion - d.h. nur bei einer einzigen Konzentration des jeweils nicht variierten Substrates - bestimmt (LEVIN u. SPRINSON, 1964; BODE u. BIRNBAUM, 1981a; LEIFELD, 1982). Die so erhaltenen Werte sind jedoch nur aussagekräftig, wenn für beide Substrate die Dissoziationskonstanten gleich der Michaelis-Konstanten sind.

Für die Hinreaktion der EPSP-Synthase aus A. aerogenes 62-1 muß ein Zufallsmechanismus angenommen werden, da aus den Hemmversuchen mit EPSP hervorgeht, daß beide Substrate als jeweils erste an das Enzym binden können. BODE und BIRNBAUM (1981 a) geben für die EPSP-Synthase aus der Hefe Hansenula henricii eine sequentielle Bindungsfolge der Substrate an, ohne jedoch nähere Angaben darüber zu machen, welches Substrat als erstes gebunden wird und aus welchen Daten sie diese Schlußfolgerung ableiten.

Bezüglich der Rückreaktion kann keine eindeutige Aussage gemacht werden, da die erhaltenen Daten sowohl mit einem Zufallsmechanismus als auch mit einer festen Reihenfolge der Substratbindung in Einklang stehen. Hier müssen weitere Untersuchungen Klarheit bringen.

Lineweaver-Burk-Diagramme der Hinreaktion ergaben weder mit PEP noch mit S-3-P als variablem Substrat lineare Funktionen. Die Untersuchung der Rückreaktion erbrachte zwar lineare Beziehungen zwischen 1/v und dem Kehrwert der EPSP-Konzentration, nicht jedoch zwischen 1/v und dem Kehrwert der P_i-Konzentration.

Die Linearität der in der doppelt reziproken Darstellung mit EPSP als variablem Substrat erhaltenen Funktionen mag jedoch lediglich darauf zurückzuführen sein, daß die EPSP-Konzentrationen nicht hoch genug gewählt wurden.

Die in hohen P_i-Konzentrationen in der Rückreaktion auftretende Substrathemmung war wahrscheinlich auf eine Anlagerung von P_i an die EPSP-Bindungsstelle zurückzuführen, da sie kompetitiv im Hinblick auf EPSP war.

Es gibt eine Reihe von Modellen, die nicht lineare Lineweaver-Burk-Diagramme mit bezüglich der x-Achse konkaver Krümmung erklären können (vgl. CLELAND, 1970). Eine Möglichkeit, die negative Kooperativität, kann wohl ausgeschlossen werden, da kein Hinweis auf einen oligomeren Aufbau des Enzyms erhalten werden konnte. Auch unter-

schiedliche aktive Zentren an einem Polypeptid scheinen nicht sehr wahrscheinlich, da mit einer solchen Hypothese zwar die konkave Krümmung, nicht aber die Aktivierung des Enzyms durch Anionen und Substrate erklärt werden kann.

Für das Vorliegen von Isoenzymen mit unterschiedlicher Substrataffinität konnte ebenfalls kein Anhaltspunkt gefunden werden. Es erscheint jedoch vorstellbar, daß in Abhängigkeit vom Ionenmilieu zwei verschiedene Enzymtypen vorliegen: eine nicht aktivierte und eine, nach Anlagerung eines Anions oder mehrerer Anionen, aktivierte Form. Die Funktion der Substratabhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit würde sich dann aus zwei Thermen zusammensetzen: einem für die nicht aktivierte und einem für die aktivierte Form (CLELAND, 1970; die Gleichung gilt für Enzyme mit einem Substrat bzw. mit zwei Substraten, wenn dabei ein Substrat konstant gehalten wird):

$$V = \frac{V_1 \; A}{K_{a1}+V} + \frac{V_2 \; A}{K_{a2}+V}$$

$V_1=V_{max}$ der nicht aktivierten Form

$K_{a1}=K_a$ der nicht aktivierten Form

$V_2=V_{max}$ der aktivierten Form

$K_{a2}=K_a$ der aktivierten Form

Ist das variable Substrat der alleinige Aktivator, so wird bei niedriger Substratkonzentration V_2 gleich 0, da V_2 proportional der Enzymmenge der aktivierten Enzymform ist und alles Enzym in nicht aktiviertem Zustand vorliegt.

Andererseits gilt für hohe Substratkonzentrationen V_1 gleich 0, da alles Enzym in die aktivierte Form überführt worden ist.

Für beide Grenzfälle wird je einer der beiden Therme der Gleichung 0, d.h. es werden lineare Beziehungen zwischen 1/V und 1/A erhalten, aus denen die Substrat-

bindungskonstanten bestimmt werden können.

Komplizierter wird es, wenn beide Substrate aktivieren. Unter der Annahme, daß nur ein aktivierter Zustand des Enzyms existiert, unabhängig davon, ob er durch die Anlagerung von Substrat 1 oder Substrat 2 herbeigeführt wurde, wird für hohe Konzentrationen des variablen Substrates wiederum V_1 gleich 0. Für niedrige Konzentrationen des variablen Substrates wird V_2 nur dann gleich 0, wenn auch die Konzentrationen des konstanten Substrates hinreichend klein ist, um noch nicht aktivierend zu wirken.

Ist dieses jedoch größer, so kann das Enzym durch eine Verringerung der Konzentration des variablen Substrates nicht mehr quantitativ in den nicht aktivierten Zustand überführt werden. Die dann bei niedriger Konzentration des variablen Substrates abgeleiteten Bindungskonstanten können zu groß oder zu klein ausfallen (CLELAND, 1970).

Da die erhaltenen Ergebnisse darauf hindeuten, daß die EPSP-Synthase aus A. aerogenes 62-1 durch beide Substrate aktiviert wird, müssen die ermittelten Bindungskonstanten mit einem gewissen Vorbehalt betrachtet werden.

LEVIN und SPRINSON (1964) und LEIFELD (1982) erhielten mit der EPSP-Synthase aus E. coli bzw. Corydalis sempervirens Zellkulturen lineare Beziehungen zwischen 1/v und 1/S. Ein Grund hierfür könnte - außer in unterschiedlichen Enzymeigenschaften - auch in den verwendeten Puffersystemen liegen. In beiden Arbeiten wurde 50 mM bzw. 100 mM Tris/Maleinsäure verwendet, ein Puffer, der bei niedrigen Substratkonzentrationen aktivierend auf die EPSP-Synthase aus A. aerogenes 62-1 wirkt. In 100 mM dieses Puffers konnten auch mit den Enzymen aus A. aerogenes 62-1 lineare Lineweaver-Burk-Diagramme erhalten werden (Abb. 75).

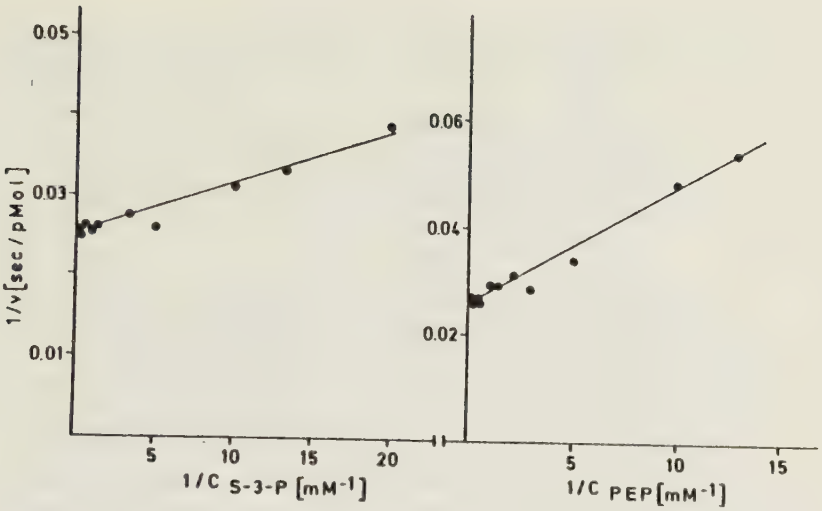


Abb. 75: Doppelt reziproke Darstellung der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration in 0.1 M Tris/Maleinsäure/NaOH-Puffer

a) S-3-P als variiertes Substrat, PEP = 5 mM
b) PEP als variiertes Substrat, S-3-P = 5 mM

Es ist daher anzunehmen, daß die Nichtlinearität in Hepes-Puffer tatsächlich auf das Vorhandensein verschieden aktiver Enzymformen zurückzuführen ist.

Aus den linearen Bereichen der Lineweaver-Burk-Diagramme der Hinreaktion konnte ein "equilibrium ordered"-Mechanismus (CLELAND, 1977) der Substratbindung abgeleitet werden.

Wenig wahrscheinlich erscheint jedoch, daß ausgerechnet das jeweils in niedriger Konzentration vorliegende Substrat obligatorisch vor dem in höherer Konzentration vorliegenden Substrat gebunden wird. Bei einem Zufallsmechanismus sollte von den beiden Substraten dasjenige statistisch gesehen als erstes angelagert werden, das im Verhältnis zu der Dissoziationskonstanten des jeweiligen Enzym-Substrat-Komplexes in höherer Konzentration vorhanden ist. Die Dissoziationskonstanten für S-3-P und PEP lagen jedoch in

vergleichbaren Größenordnungen ($K_{I(S-3-P)}$ = 24 µM, $K_{I(PEP)}$ = 43 µM).

Die Alternative, daß ein Substrat als Aktivator wirkt, der nicht vom Enzym abdissoziieren kann, solange das jeweils andere Substrat an das Enzym gebunden ist, steht dagegen in guter Obereinstimmung mit der Hypothese, daß die Substrate als Anionen die EPSP-Synthase aktivieren.

Die Tatsache, daß die Dissoziationskonstanten beider Substrat-Enzym-Komplexe von der jeweiligen Substratkonzentration abhängen, könnte dann auf eine durch die Aktivierung des Enzyms hervorgerufene Abnahme der Affinität des Enzyms zu den Substraten zurückzuführen sein.

Andererseits wäre auch denkbar, daß die Abhängigkeit der Dissoziationskonstanten der Substrat-Enzym-Komplexe von der Konzentration der jeweiligen Substrate lediglich Ausdruck jeweils zweier verschiedener Enzym-Substrat-Dissoziationskonstanten pro Substrat ist, die in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen liegen und von denen eine die Anlagerung des Substrates an das aktive Zentrum, die andere die Anlagerung des Substrates an die "Aktivierungsstelle" charakterisiert.

Sinnvoll wäre es, die Substratbindungskonstanten noch auf andere Art und Weise zu bestimmen, um eine Absicherung der hier erhaltenen Daten und damit auch ihrer Interpretation zu ermöglichen. Der Einsatz der Gleichgewichtsdialyse scheiterte jedoch an der geringen zur Verfügung stehenden Enzymmenge.

Glyphosat hemmte die EPSP-Synthase aus A. aerogenes 62-1 reversibel. Die Hemmung war kompetitiv gegenüber PEP und nicht kompetititv gegenüber S-3-P, EPSP und P_i. Zu dem gleichen Ergebnis kam LEIFELD (1982) mit einer pflanzlichen EPSP-Synthase, jedoch untersuchte er nur die Hinreaktion. Die von ihm bestimmte K_I ist mit 10 µM (PEP als variiertes Substrat) deutlich größer als die des bakteriellen Enzyms (1 µM). Das Verhältnis zwischen $K_{I(PEP)}$

und $K_{I(Glyphosat)}$ ist bei beiden Enzymen recht ähnlich (28 (LEIFELD, 1982), bzw. 40).

Glyphosin, Aminomethylphosphonsäure und Iminodiessigsäure, die alle große strukturelle Ähnlichkeit mit Glyphosat besitzen, hemmten beide Enzyme nicht (LEIFELD, 1982).

Interessant erscheint, daß 1-Hydroxycyclopropancarbonsäurephosphat, das eine Reihe PEP-umsetzender Enzyme, wie PEP-Carboxylase, Pyruvat-Kinase und Enolase sehr empfindlich kompetitiv gegenüber PEP hemmt (O'LEARY et al., 1981) und Fosfomycin, ein irreversibler Inhibitor der Enoylpyruvat -Transferase (ANWAR et al., 1971; CASSIDY u. KAHAN, 1973), die EPSP-Synthase aus A. aerogenes 62-1 weder hemmen noch inaktivieren. Es ist daher anzunehmen, daß das aktive Zentrum der EPSP-Synthase - und insbesondere die PEP-Bindungsstelle - sich von denjenigen anderer PEP-umsetzender Enzyme wesentlich unterscheidet.

Unter der Voraussetzung, daß Glyphosat an die PEP-Bindungsstelle der EPSP-Synthase bindet, wird die Hypothese noch dadurch unterstützt, daß 1 mM Glyphosat weder die Enoylpyruvat -Transferase aus Salmonella typhimurium noch die PEP-Synthase aus E. coli, noch die Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskel oder die Enolase aus Kaninchenmuskel hemmt (AMRHEIN, persönliche Mitteilung). Aus den Inaktivierungsversuchen läßt sich erkennen, daß Glyphosat - auch in Abwesenheit der Substrate - relativ fest an das Enzym gebunden wird, da es sehr effektiv gegen alle drei verwendeten inaktivierenden Reagenzien schützt.

Besonders ausgeprägt ist dieser Effekt gegenüber 3-Brompyruvat und NEM, Verbindungen, die mit SH-Gruppen reagieren. Glyphosat verhindert erheblich effektiver die Inaktivierung des Enzyms als alle Substrate; sogar besser als EPSP, dessen Bindungskonstante etwa mit der K_I von Glyphosat vergleichbar ist. PEP dagegen schützt nicht

gegen 3-Brompyruvat und nur wenig gegen NEM.

Sollten PEP und Glyphosat den gleichen Bindungsort im aktiven Zentrum besetzen, so muß eine Erklärung dafür gefunden werden, daß Glyphosat ausgezeichnet, PEP aber kaum oder gar nicht das Enzym gegen diese Reagenzien abschirmt. Die gegenüber Glyphosat niedrige Affinität des Substrates PEP zu der EPSP-Synthase kann dafür nicht allein verantwortlich sein.
Es scheint daher nicht ausgeschlossen, daß der starke SH-Gruppen schützende Effekt von Glyphosat nicht nur auf die hohe Affinität zu dem Enzym, sondern auf eine direkte Wechselwirkung mit einer freien SH-Gruppe zurückzuführen ist; z.B. durch eine Ionenbindung zwischen einem Mercaptidion und der unter physiologischen Bedingungen positiv geladenen, d.h. protonierten Iminogruppe des Herbizids (pK_a = 10.6 (SPRANKLE et al., 1975)).

Die mit dem pH-Wert zunehmende Hemmung der EPSP-Synthase durch Glyphosat ließe sich dann auf die - ebenfalls mit dem pH-Wert zunehmende - Dissoziation der SH-Gruppe zurückführen.

Für einige Enzyme, die PEP umsetzen, darunter auch für die EPSP-Synthase, wurde im aktiven Zentrum neben bindungsspezifischen Gruppen eine schwache Säure gefordert, die während der Katalyse reversibel ein Proton auf das C-3 von PEP überträgt, um an dessen C-2 ein elektrophiles Zentrum zu etablieren, das von einem Nukleophil, z.B. OH-Gruppen, angegriffen werden kann (NOWAK u. MILDVAN, 1970; HOVING et al., 1981; LEVIN u. SPRINSON, 1964; GRIMSHAW et al., 1982). Eine solche schwache Säure könnte u.a. eine freie SH-Gruppe sein.

Projiziert man die Strukturformeln von PEP und Glyphosat übereinander, so ist deutlich zu erkennen, daß nicht nur zwischen Phospho- und Carboxylgruppe (PEP) und Phosphono- und Carboxylgruppe (Glyphosat) der gleiche Abstand besteht, sondern auch die restlichen Atome, insbesondere

alle Seitengruppen, eine ähnliche Konfiguration einnehmen (Abb. 76).

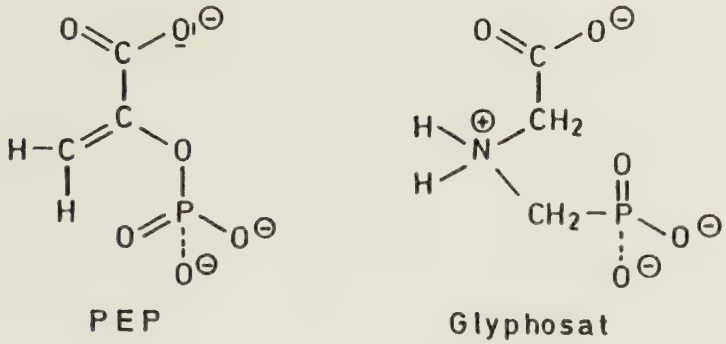


Abb. 76 :Vergleich der Strukturformeln von PEP und Glyphosat

Wird nun ein Proton an das C-3 des PEPs angelagert, so daß die Doppelbindung geöffnet wird und C-3 und C-2 in sp^3-Hybride überführt werden, so konnte anhand von räumlichen Modellen beider Moleküle gezeigt werden, daß, bei identischer räumlicher Anordnung der beiden Carboxylgruppen und der Phospho- bzw. Phosphonogruppe beider Moleküle, die Iminogruppe des Glyphosats und die CH_3-Gruppe des protonierten PEPs exakt die gleiche räumliche Position einnehmen. Da solche Modelle in zweidimensionalen Abbildungen den größten Teil ihrer Aussagekraft verlieren, wurde auf ihre Darstellung verzichtet.

Es ist daher gut vorstellbar, daß Glyphosat an die gleiche Stelle des Enzyms gebunden wird wie PEP. Hierbei könnte eine als Säure an der Katalyse beteiligte SH-Gruppe in Form des Mercaptidions einen wesentlichen Beitrag zur Bindung von Glyphosat liefern, das somit pH-abhängig erheblich fester als PEP gebunden werden kann (Abb. 77).

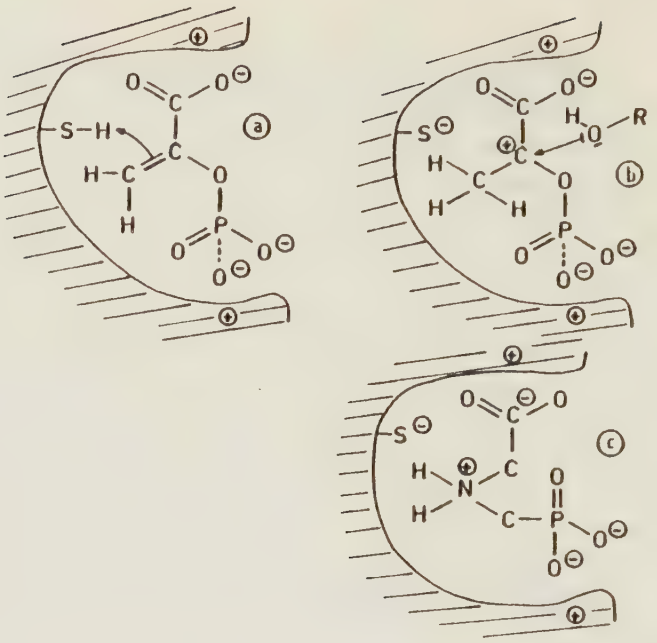


Abb. 77 : Modell für die Bindung von PEP (a), des Übergangszustandes nach der Protonierung (b) und von Glyphosat (c) an das aktive Zentrum der EPSP-Synthase

Da Glyphosat mit dem hypothetischen Übergangszustand von PEP (mit sp^3-Hybrid am C-3) wesentlich mehr Ähnlichkeit hat als mit PEP, wäre das Herbizid wohl eher als Transition-State-Analogon denn als Strukturanalogon anzusehen.

2. Oberlegungen zu einem möglichen Zusammenhang zwischen der Hemmung der EPSP-Synthase und der herbiziden Wirkung von Glyphosat

Eine ganze Reihe von Indizien deutet darauf hin, daß die Hemmung der EPSP-Synthase - und damit auch der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren - auch in vivo in Glyphosat-behandelten Organismen eine wesentliche Rolle spielt. So konnte neben den Fütterungsversuchen von JAWORSKI (1972), HADERLIE et al.(1977) und GRESSHOFF (1979), die eine Aufhebung der durch Glyphosat hervorgerufenen Wachstumshemmung durch gleichzeitige Applikation der aromatischen Aminosäuren beschrieben, die Blockierung der Phenylpropan-Synthese in Buchweizenhypokotylen (HOLLÄNDER u. AMRHEIN, 1980), und der Biosynthese der aus Chorismin-säure abgeleiteten Anthrachinone in Galium mollugo Zell-kulturen (AMRHEIN et al., 1980) beobachtet werden. Glyphosatzugabe zum Medium führt in E. coli zu einer De-repression der DAHP-Synthase; die Aktivitäten einer Reihe anderer Enzyme des Shikimisäureweges werden etwas erhöht (ROISCH u. LINGENS, 1980).

Eine Induktion der Phenylalanin-Ammonium-Lyase, des Schlüsselenzyms des Phenylpropanstoffwechsels, wurde in verschiedenen Pflanzen nach Glyphosat-Applikation beob-achtet (DUKE u. HOAGLAND, 1978; HOAGLAND et al., 1979; DUKE et al., 1979; COLE et al., 1980). Prinzipiell scheinen zwei Erklärungen denkbar (FEDTKE, 1982):

a) die Regulation des Enzyms wird direkt beeinflußt
b) durch die Applikation des Herbizids wird der endogene Gehalt an Phenylpropanen herabgesetzt, was wiederum über eine Art Feedback-Kontrolle zu einer Erhöhung der Phenylalanin-Ammonium-Lyase-Aktivität führt (HOLLÄNDER u. AMRHEIN, 1980; COLE u. DODGE, 1980)

Für eine Feedback-Regulation der Phenylalanin-Ammonium-Lyase über den Phenylpropangehalt in einigen Pflanzen sprechen Versuche mit α-Aminooxy-β-phenylpropionsäure, einem sehr effektiven Inhibitor der Phenylalanin-Ammonium-Lyase und damit gleichzeitig der Phenylpropanbiosynthese,

der eine Oberinduktion der extrahierbaren Phenylalanin-Ammonium-Lyase in Gurkenkeimlingen (AMRHEIN u. GERHARDT, 1979) und eine Induktion der de novo-Synthese der Phenylalanin-Ammonium-Lyase in Daucus carota Zellkulturen (NOE u. SEITZ, 1982) hervorruft.

Mit Glyphosat behandelte Pflanzen oder pflanzliche Zellkulturen akkumulieren Shikimisäure, zum Teil weit über 10% des Trockengewichtes (AMRHEIN et al., 1981; SCHULZ, 1982). HOLLÄNDER-CZYTKO und AMRHEIN (1982) konnten zeigen, daß Zellkulturen von Fagopyrum esculentum Moench die in Gegenwart von Glyphosat akkumulierende Shikimisäure fast ausschließlich in der Vakuole speichern. Da isolierte Vakuolen in der Lage sind, aus dem Inkubationsmedium S-3-P aufzunehmen und zu Shikimisäure umzusetzen (HOLLÄNDER-CZYTKO u. AMRHEIN, 1982), ist anzunehmen, daß die Shikimisäureakkumulation direkt auf eine Hemmung der EPSP-Synthase zurückzuführen ist; d.h. daß primär akkumulierendes S-3-P in der Vakuole dephosphoryliert wird und die entstehende Shikimisäure akkumuliert.

Fraglich erscheint bis jetzt, woran Glyphosat-behandelte Pflanzen letztlich zugrunde gehen und ob alle von dem Herbizid in der Pflanze hervorgerufenen physiologischen und morphologischen Veränderungen direkt oder indirekt auf die Hemmung der EPSP-Synthase zurückgeführt werden können.

Glyphosat-ähnliche Verbindungen wie Glyphosin, Aminomethylphosphonsäure und Iminodiessigsäure, die keine herbizide Aktivität aufweisen, hemmen weder die EPSP-Synthase aus A. aerogenes 62-1 noch das Enzym aus Corydalis sempervirens Zellkulturen (LEIFELD, 1982). Wegen der hohen Strukturverwandtschaft dieser Verbindungen mit Glyphosat ist schwer vorstellbar, daß noch weitere Wirkungsorte mit der gleichen hohen Spezifität für Glyphosat vorhanden sein könnten; allerdings kann dies nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Eine Erhöhung des endogenen Shikimisäure-Gehaltes sollte nicht direkt toxisch wirken, da einige Pflanzen, z.B. Ginkgo biloba, unter normalen Bedingungen ähnlich hohe Shikimisäuremengen akkumulieren (AMRHEIN et al., 1981). Da Supplementierungsversuche mit den drei aromatischen Aminosäuren die herbizide Wirkung von Glyphosat in intakten Pflanzen nicht aufheben können (DUKE u. HOAGLAND, 1978; DUKE u. HOAGLAND, 1981; COLE et al., 1980), scheint die Verknappung an aromatischen Aminosäuren nicht in jedem Fall der wesentliche Punkt zu sein. In einer ganzen Reihe von Organismen führt Glyphosat tatsächlich nicht zu einer Verringerung des Pools löslicher aromatischer Aminosäuren (HADERLIE et al., 1977).

Jedoch kann dieser bei mangelnder Synthese auch durch Proteinabbau aufgefüllt werden, so daß aus einer gleichbleibenden Poolgröße nicht unbedingt auf eine gleichbleibende Neusynthese der aromatischen Aminosäuren geschlossen werden kann.

Auffallend ist, daß in vielen Fällen eine Aufhebung der wachstumshemmenden Wirkung von Glyphosat durch aromatische Aminosäuren dann möglich ist, wenn die behandelten Organismen sich in wäßrigem Milieu befinden: Lemna gibba, Rhizobium japonicum (JAWORSKI, 1972), Chlamydomonas (GRESSHOFF, 1979), Zellkulturen von Daucus carota L. und Glycine max (L.) Merr. (GRESSHOFF, 1979). In Landpflanzen wird der Einfluß von Glyphosat häufig kaum oder gar nicht durch eine gleichzeitige Fütterung aromatischer Aminosäuren beeinflußt: Zea mays (DUKE u. HOAGLAND, 1978), Phaseolus aureus (DUKE u. HOAGLAND, 1981), Agropyron repens (COLE et al., 1980).

Eine Hypothese, die diese Beobachtung erklären könnte, wäre die Anhäufung eines mehr oder weniger toxischen niedermolekularen Metaboliten. Im wäßrigen Milieu lebende Organismen könnten in der Lage sein, diese akkumulierende Verbindung an das Medium abzugeben, Landpflanzen dagegen nicht. Ein Beispiel hierfür wäre eine Ammoniak-

vergiftung (KILLMER et al., 1981): zum einen wird Ammoniak nicht mehr für die Biosynthese aromatischer Aminosäuren verbraucht, zum anderen bindet die enorme Akkumulation von Shikimisäure viel Kohlenstoff, der dann für Akzeptoren der NH_3-Fixierung, z.B. Glutaminsäure oder α-Ketoglutarat, nicht mehr zur Verfügung steht.

Tatsächlich wurde in einigen Pflanzen nach Behandlung mit Glyphosat eine Akkumulation von Ammoniak und Glutamin festgestellt (NIELSSON, 1977; HADERLIE et al., 1977; DUKE et al., 1979; HOAGLAND et al., 1979). KILLMER et al. (1981) konnten darüber hinaus zeigen, daß eine in Zellkulturen von Daucus carota L. durch Glyphosat hervorgerufene Wachstumshemmung durch Intermediate des Citrat-Cyclus, aus dem ja die wichtigsten NH_3-Akzeptoren α-Ketoglutarsäure und Glutaminsäure stammen, und durch Glutaminsäure aufgehoben werden kann.

Ein sicherer Nachweis einer direkt zum Tode der Pflanze führenden Wirkkette steht trotz aller Versuche, das zur Verfügung stehende Material in die eine oder andere Hypothese zu zwingen, noch aus.

So kann bis jetzt über die eigentliche Ursache des Absterbens Glyphosat-behandelter Pflanzen nichts Sicheres ausgesagt werden, obwohl ein auch in vivo relevanter direkter Wirkungsort aufgefunden wurde.
Es muß zukünftigen Untersuchungen vorbehalten bleiben, diese Lücke zu schließen.

V. Zusammenfassung

1. Der Einfluß des Herbizids Glyphosat auf die Aktivitäten der Enzyme Shikimat-Kinase (EC 2.7.1.71), 5-Enolpyruvoylshikimisäure-3-Phosphat-Synthase (EC 2.5.1.19), Chorismat-Synthase (EC 4.6.1.4) und Anthranilat-Synthase (EC 4.1.3.27) aus Aerobacter aerogenes 62-1 wurden in vitro untersucht. Von diesen vier Enzymen wurde von Glyphosat-Konzentrationen $\leq$ 1 mM nur die EPSP-Synthase gehemmt. Die Aktivität der EPSP-Synthase aus E. coli wurde durch das Herbizid ebenfalls erheblich herabgesetzt.

2. Die EPSP-Synthase aus A. aerogenes 62-1 wurde bei 49% Ausbeute ca. 3300fach bis zur angenäherten Homogenität angereichert. Nach Polyacrylamidgel-Elektrophorese des gereinigten Enzyms in An- und Abwesenheit von SDS und anschließender Anfärbung der Gele mit Serva Blau G wurde jeweils 99% des gebundenen Farbstoffes in einer Bande gefunden, die auch die Enzymaktivität enthielt (Elektrophorese unter nicht denaturierenden Bedingungen).

   Hinweise auf das Vorliegen multipler Enzymformen konnten nicht erhalten werden.

3. Die Stabilität der gereinigten EPSP-Synthase wurde stark durch den pH-Wert, die Art des Puffers, die Anwesenheit von mit SH-Gruppen reagierenden Verbindungen so wie durch Komplexbildner beeinflußt.

   Sowohl starke Reduktionsmittel als auch starke Oxidationsmittel und Schwermetallionen verminderten die Enzymaktivität. Metallionen-komplexierende Verbindungen und einige SH-Reagenzien stabilisierten die EPSP-Synthase. Der pH-Bereich optimaler Stabilität war pufferabhängig und lag zwischen pH 6.5 und pH 8.5 .

4. Das Molekulargewicht der EPSP-Synthase wurde durch Gelchromatographie mit 32,400 D, durch SDS-Polyacryamidgel-Elektrophorese mit 42,900 D ermittelt. Es kann daher davon ausgegangen werden, daß das Enzym nur aus einer Peptidkette besteht.

   Der IEP konnte durch isoelektrische Fokussierung und Chromatofokussierung übereinstimmend mit pH 4.6 ermittelt werden.

5. Das pH-Optimum sowohl der Hin- als auch der Rückreaktion war durch zwei Maxima gekennzeichnet, die bei pH 5.4 und pH 6.8 (Hinreaktion) bzw. pH 5.6 und pH 7.6 (Rückreaktion) lagen.

   Die Aktivierungsenergie der von der EPSP-Synthase katalysierten Reaktion wurde mit 54.2 kJ/Mol (Hinreaktion) und 64.1 kJ/Mol (Rückreaktion) aus der Temperaturabhängigkeit der Enzymaktivität bestimmt.

6. Die Aktivität der EPSP-Synthase war bei niedrigen Substratkonzentrationen (0.2 mM) in hohem Maße von Anionen beeinflußbar, die in niedrigen Konzentrationen aktivierend, in hohen jedoch hemmend wirkten. Bei hohen Substratkonzentrationen (5 mM) wurde lediglich eine leichte Hemmung der Enzymaktivität in hohen Ionenkonzentrationen beobachtet.

7. Die Lineweaver-Burk-Diagramme der Hinreaktion ergaben für keines der beiden Substrate lineare Beziehungen zwischen 1/v und 1/S. Die Dissoziationskonstanten für die jeweiligen Enzym-Substrat-Komplexe wurden aus den linearen Bereichen der Diagramme mit 43 µM (PEP) und 22 µM (S-3-P) , die Michaelis-Konstanten für beide Substrate mit 1.7 mM bestimmt.

   Die doppelt reziproke Darstellung von 1/v und 1/S

in der Rückreaktion ergab nur für EPSP als variables Substrat, nicht jedoch für P_i als variable Substrat lineare Funktionen. Aus den in diesen Darstellungen erhaltenen Geraden, die sich jeweils auf der Abzisse schnitten, wurden $K_{(EPSP)}$ mit 1.3 µM und $K_{(P_i)}$ mit 2.6 mM bestimmt.

Durch Hemmversuche mit den jeweiligen Produkten wurde für die Hinreaktion ein Zufallsmechanismus der Anlagerung der Substrate an das Enzym wahrscheinlich gemacht.

Es wurde angenommen, daß die Nichtlinearität der in den Lineweaver-Burk-Diagrammen erhaltenen Funktionen auf das Vorliegen zweier verschieden aktiver Zustände zurückzuführen ist, die durch eine Anlagerung der Substrate oder auch anderer Anionen an das Enzym entstehen.

8. Glyphosat hemmte die EPSP-Synthase aus A. aerogenes 62-1 reversibel und kompetitiv bezüglich PEP, nicht kompetitiv im Hinblick auf S-3-P, EPSP und P_i. Die Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes wurde bei pH 6.8 mit 1 µM bestimmt.

   Die Hemmung war stark pH-abhängig und nahm mit dem pH-Wert zu.

   Glyphosin, Aminomethylphosphonsäure und Iminodiessigsäure, die mit Glyphosat große strukturelle Ähnlichkeit haben und keine herbizide Aktivität aufweisen, hatten auf die Aktivität der EPSP-Synthase keinen Einfluß.

9. Fosfomycin und 1-Hydroxycyclopropancarbonsäurephosphat, die als PEP-analoge Verbindungen eine Reihe PEP-umsetzender Enzyme hemmen oder inaktivieren, wirkten weder hemmend noch inaktivierend auf die EPSP-Synthase.

   Ebenfalls ohne Einfluß auf die Enzymaktivität waren die aromatischen Aminosäuren.

10. Aus Inaktivierungsexperimenten ließ sich erkennen, daß Glyphosat die EPSP-Synthase mit hoher Effektivität gegen eine Inaktivierung durch NEM und 3-Brompyruvat, d.h. mit SH-Gruppen reagierende Verbindungen, schützte; sogar effektiver als EPSP, das etwa die gleiche Affinität zu dem Enzym wie das Herbizid besitzt.

    Es konnte wahrscheinlich gemacht werden, daß sich Argininreste oder auch Aminosäuren mit freien Aminogruppen im aktiven Zentrum der EPSP-Synthase befinden, da fast alle Substrate und Glyphosat die Inaktivierung des Enzyms durch Phenylglyoxal verzögerten.

11. Es wurde versucht, auf der Grundlage dieser Ergebnisse ein Modell zu entwerfen, daß die Bindung des Herbizids an das aktive Zentrum der EPSP-Synthase beschreibt. Hierbei wurde eine schwache Säure postuliert, wahrscheinlich eine SH-Gruppe, die als Säure während der Katalyse reversibel das C-3 von PEP protoniert und als Anion durch Ausbildung einer Ionenbindung mit der positiv geladenen, d.h. protonierten Iminogruppe des Glyphosats wesentlich zur Bindung des Herbizids an das Enzym beiträgt.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

AHMED, S.I. und GILES, N.H.: Organization of Enzymes in the Common Aromatic Synthetic Pathway: Evidence for Aggregation in Fungi.
J. Bacteriol. 99, 231 (1969)

AMRHEIN, N., DEUS, B., GEHRKE, P.und STEINROCKEN, H.C.: The Site of the Inhibition of the Shikimate Pathway by Glyphosate.
II. Interference of Glyphosate with Chorismic Acid Formation in vivo and in vitro.
Plant Physiol. 66, 830 (1980)

AMRHEIN, N., DEUS, B., GEHRKE, P., HOLLÄNDER, H., SCHAB, J., SCHULZ, A. und STEINROCKEN, H.C.: Interference of Glyphosate with the Shikimate Pathway.
Proc. Plant Growth Regul. Soc. Am. 8, 99 (1981)

AMRHEIN, N. und GERHARDT, J.: Superinduction of Phenylalanine Ammonia-Lyase in Gherkin Hypocotyls Caused by the Inhibitor, L-α-Aminooxy-β-phenylpropionic Acid.
Biochim. Biophys. Acta 583, 434 (1979)

ANWAR, R.A., SODEK, J. und ZEMELL, R.I.: Feedback Inhibition and Binding Studies on Pyruvate-Uridine Diphospho-N-acetylglucosamine Transferase.
Fed. Proc. 30, 1284 (1971)

ANWAR, R.A. und VLAOVIC, M.: Effect of Phosphoenolpyruvate Analogs on the Activity of Enolpyruvate Transferase and the Effect of UDP-N-acetylglucosamine on the Reactivity of the Active Site SH Group.
Biochim. Biophys. Acta 616, 389 (1980)

BAILLIE, A.C., CORBETT, J.R., DOWSETT, J.R. und McCLOSKEY, P.: Inhibitors of Shikimate Dehydrogenase as Potential Herbicides.
Pestic. Sci. 3, 113 (1972)

BAUR, J.R.: Effect of Glyphosate on Auxin Transport in Corn and Cotton Tissues.
Plant Physiol. 63, 882 (1979)

BAUR, J.R., BOVEY, R.W. und VEECH, J.A.: Growth Responses in Sorghum and Wheat Induced by Glyphosate.
Weed Sci. 25, 238 (1977)

BENSADOUN, A. und WEINSTEIN, D.: Assay of Proteins in the Presence of Interfering Materials.
Anal. Biochem. 70, 241 (1976)

BERLYN, M.B., AHMED, S.I. und GILES, N.H.: Organization of Polyaromatic Biosynthetic Enzymes in a Variety of Photosynthetic Organisms.
J. Bacteriol. 104, 768 (1970)

BERLYN, M.B. und GILES, N.H.: Organization of Enzymes in the Polyaromatic Synthetic Pathway: Separability in Bacteria.
J. Bacteriol. 99, 222 (1969)

BISSWANGER, H.: Theorie und Methoden der Enzymkinetik
Verlag Chemie, Weinheim (1979)

BODE, R. und BIRNBAUM, D.: Eigenschaften und Regulation der Enzyme des Shikimat-Pathway von Hansenula henricii.
Biochem. Physiol. Pflanzen 176, 329 (1981 a)

BODE, R. und BIRNBAUM, D.: Aggregation und Trennbarkeit der Enzyme des Shikimat-Pathway bei Hefen.
Z. Allg. Microbiol. 21, 417 (1981 b)

BONDINELL, W.E., VNEK, J., KNOWLES, P.F., SPRECHER, M. und SPRINSON, D.B.: On the Mechanism of 5-Enolpyruvylshikimate 3-Phosphate Synthetase.
J. Biol. Chem. 246, 6191 (1971)

BRADFORD, M.M.: A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye-Binding.
Anal. Biochem. 72, 248 (1976)

BRECKE, B.J. und DUKE, W.B.: Effect of Glyphosate on Intact Bean Plants (Phaseolus vulgaris L.) and Isolated Cells.
Plant Physiol. 66, 656 (1980)

CAMPBELL, W.F., EVANS, J.O. und REED, S.C.: Effects of Glyphosate on Chloroplast Ultrastructure of Quackgrass Mesophyll Cells.
Weed Sci. 24, 22 (1976)

CARTER, R.P., CARROLL, R.L. und IRANI, R.R.: Nitrilotri(methylenephosphonic Acid), Ethyliminodi(methylenephosphonic Acid), and Diethylaminomethylphosphonic Acid: Acidity and Calcium(II) and Magnesium(II) Complexing.
Inorg. Chem. 6, 939 (1967)

CASSIDY, P.J. und KAHAN, F.M.: A Stable Enzyme-Phosphoenolpyruvate Intermediate in the Synthesis of Uridine-5'-diphospho-N-acetyl-2-amino-2-deoxyglucose 3-O-Enolpyruvyl Ether.
Biochemistry 12, 1364 (1973)

CHASE, R.L. und APPLEBY, A.P.: Effects of Humidity and Moisture Stress on Glyphosate Controle of Cyperus rotundus L. .
Weed Res. 19, 241 (1979)

CLAUS, J.S. und BEHRENS, R.: Glyphosate Translocation and Quackgrass Rhizome Bud Kill.
Weed Sci. 24, 149 (1976)

CLELAND, W.W.: Steady State Kinetics, in: The Enzymes (Boyer, P.D., ed.) Vol.II, pp. 1-65, Academic Press, London (1970)

CLELAND, W.W.: Determining the Chemical Mechanisms of Enzyme-Catalyzed Reactions by Kinetic Studies. In: Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology (Meister, A., ed.) Vol. 45, p. 273, Wiley, New York (1977)

COLE, D.J. und DODGE, A.D.: Effects of Glyphosate on Protein Synthesis and Phenylalanine Metabolism in Rhizome Buds of Agropyron repens.
Plant Physiol. Suppl. 63, 96 (1979)

COLE, D.J., DODGE, A.D. und CASELEY, J.C.: Some Biochemical Effects of Glyphosate on Plant Meristems.
J. Exp. Bot. 31, 1665 (1980)

COLE, K.W. und GAERTNER, F.H.: Phosphocellulose, an Affinity Chromatographic System for Chorismate Synthase and the Aromatic Complex of Neurospora crassa.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 67, 170 (1975)

COUPLAND, D. und CASELEY, J.C.: Reduction of Silica and Increase in Tillering Induced in Agropyron repens by Glyphosate.
J. Exp. Bot. 26, 138 (1975)

COUPLAND, D. und CASELEY, J.C.: Presence of ^{14}C-Activity in Root Exudates and Guttation Fluid from Agropyron repens Treated with ^{14}C-Labelled Glyphosate.
New Phytol. 83, 17 (1979)

CROFT, S.M., ARNTZEN, C.J., VANDERHOEF, L.N. und ZETTINGER, C.S.: Inhibition of Chloroplast Ribosome Formation by N,N-Bis-(Phosphonomethyl) Glycine.
Biochim. Biophys. Acta 335, 211 (1974)

D'ANS, J. und LAX, E.: Taschenbuch für Chemiker und Physiker Bd. I, Springer-Verlag, Berlin (1967)

DAWES, E.A.: Quantitative Problems in Biochemistry, Longman, London (1980)

DIXON, M. und WEBB, E.C.: Enzymes, Longmans, London (1964)

DUKE, S.O. und HOAGLAND, R.E.: Effects of Glyphosate on Metabolism of Phenolic Compounds. I. Induction of Phenylalanine Ammonia-Lyase Activity in Dark-Grown Maize Roots.
Plant Sci. Lett. 11, 185 (1978)

DUKE, S.O. und HOAGLAND, R.E.: Effects of Glyphosate on the Metabolism of Phenolic Compounds: VII. Roood-fed Amino Acids and Glyphosate Toxicity in Soybean (Glycine max)-Seedlings.
Weed Sci. 29, 297 (1981)

DUKE, S.O., HOAGLAND, R.E. und ELMORE, C.D.: Effects of Glyphosate on Metabolism of Phenolic Compounds: IV. Phenylalanine Ammonia-Lyase Activity, Free Amino Acids, and Soluble Hydroxyphenolic Compounds in Axes of Light-Grown Soybeans.
Physiol. Plant. 46, 307 (1979)

DUKE, S.O., HOAGLAND, R.E. und ELMORE, C.D.: Effects of Glyphosate on Metabolism of Phenolic Compounds: V. L-α-Aminooxy-β-phenylpropionic Acid and Glyphosate Effects on Phenylalanine Ammonia-Lyase in Soybean Seedlings.
Plant Physiol. 65, 17 (1980)

EGAN, A.F. und GIBSON, F.: Anthranilate Synthase and Anthranilate-5'-phosphoribosyl-1-pyrophosphate Phosphoribosyl Transferase (PR-Transferase) Aggregate from Aerobacter aerogenes. In: Methods in Enzymology (Colowick, S.P., Kaplan, N.O., eds.), Vol. 17, 380, Academic Press, New York (1970)

FEDTKE, C.: Biochemistry and Physiology of Herbicide Action.
Springer-Verlag, Berlin (1982)

FRANZ, J.E.: Glyphosate and Related Chemistry. In: Plenary Lect. Symp. Pap. 4th Int. Congr. Pestic. Chem. 1978 (Geissbühler, H., ed.), Adv. Pestic. Sci. 2, 139, Pergamon, Oxford (1979)

GALE, G.R.: Studies of Enzyme Kinetics. II.Inhibition of Pyruvic Carboxylase ba Certain Analogs of Pyruvic Acid.
Arch. Biochem. Biophys. 94, 236 (1971)

GIBSON, M.J. und GIBSON, F.: Preliminary Studies on the Isolation and Metabolism of an Intermediate in Aromatic Biosynthesis: Chorismic Acid.
Biochem. J. 90, 248 (1964)

GILES, N.H., CASE, M.E., PARTRIDGE, C.W.H. und AHMED, S.I.: A Gene Cluster in Neurospora crassa Coding for an Aggregate of Five Aromatic Synthetic Enzymes.
Proc. Natl. Acad. Sci. 58, 1453 (1967)

GOLLUB, E., ZALKIN, H. und SPRINSON, D.B.: Correlation of Genes and Enzymes and Studies on Regulation of the Aromatic Pathway in Salmonella.
J. Biol. Chem. 242, 5323 (1967)

GRESSHOFF, P.M.: Growth Inhibition by Glyphosate and Reversal of Its Action by Phenylalanine and Tyrosine.
Austr. J. Plant Physiol. 6, 177 (1979)

GRIMSHAW, C.E., SOGO, S.G. und KNOWLES, J.R.: The Fate of the Hydrogens of Phosphoenolpyruvate in the Reaction Catalyzed by 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate Synthase. Isotope Effects and Isotope Exchange.
J. Biol. Chem. 257, 596 (1982)

GUNETILEKE, K.G. und ANWAR, R.A.: Biosynthesis of Uridine Diphospho-N-acetylglucosamine and Characterization of Uridine Diphospho-N-acetyl-enolpyruvylglucosamine Transferase
J. Biol.Chem. 243, 5770 (1968)

HADERLIE, L.C., WIDHOLM, J.M. und SLIFE, F.W.: Effect of Glyphosate on Carrot and Tobacco Cells.
Plant Physiol. 60, 40 (1977)

HASAN, N. und NESTER, E.W.: Purification and Properties of Chorismate Synthase from Bacillus subtilis. J. Biol. Chem. 253, 4993 (1978)

HASLAM, E.: The Shikimate Pathway. Biosynthesis of Natural Products Series (Barton, D., Kirby, G., eds.) Butterworths, London (1974)

HESS, H.H. und DERR, J.E.: Assay of Inorganic and Organic Phosphorus in the 0.1-5 Nanomole Range. Anal. Biochem. 63, 607 (1975)

HOAGLAND, R.E., DUKE, S.O. und ELMORE, C.D.: Effects of Glyphosate on Metabolism of Phenolic Compounds. III. Phenylalanine Ammonia-Lyase Activity, Free Amino Acids, Soluble Protein and Hydroxyphenolic Compounds in Axes of Dark-grown Soybeans. Physiol. Plant. 46, 357 (1979)

HOLLÄNDER, H.: Inhibitoren der Phenylpropansynthese in Fagopyrum esculentum Moench. Dissertation, Ruhr-Universität Bochum (1979)

HOLLÄNDER, H. und AMRHEIN, N.: The Site of the Inhibition of the Shikimate Pathway by Glyphosate. I. Inhibition by Glyphosate of Phenylpropanoid Synthesis in Buckwheat (Fagopyrum esculentum Moench). Plant Physiol. 66, 823 (1980)

HOLLÄNDER-CZYTKO, H. und AMRHEIN, N.: Subcellular Compartimentation of Shikimic Acid and Phenylalanine in Buckwheat Cell Suspension Cultures Grown in the Presence of Shikimate Pathway Inhibitors. zur Veröffentlichung eingereicht (1982)

HOLLEMAN, A.F. und WIBERG, E.: Lehrbuch der Anorganischen Chemie, de Gruyter, Berlin (1976)

HOVING, H., LOLKEMA, J.S. und ROBILLARD, G.T.: Escherichia coli Phosphoenolpyruvate-dependent Phosphotransferase System: Equilibrium Kinetics and Mechanism of Enzym I Phosphorylation. Biochemistry-USA 20, 87 (1981)

ITAYA, K. und UI, M.: A New Micromethod for the Colorimetric Determination of Inorganic Phosphate. Clin. Chim. Acta 14, 361 (1966)

IVANY, J.A.: Quackgrass (Agropyron repens) Control with Fall-applied Glyphosate and Other Herbicides. Weed Sci. 29, 382 (1981)

JAWORSKI, E.G.: The Mode of Action of N-Phosphonomethylglycine: Inhibition of Aromatic Amino Acid Biosynthesis.
J. Agr. Food Chem. 20, 1195 (1972)

KILLMER, J., WIDHOLM, J. und SLIFE, F.: Reversal of Glyphosate Inhibition of Carrot Cell Culture Growth by Glycolytic Intermediates and Organic and Amino Acids.
Plant Physiol. 68, 1299 (1981)

KITCHEN, L.M., WITT, W.W. und RIECK, C.E.: Inhibition of δ-Aminolevulinic Acid Synthesis by Glyphosate. Weed Sci. 29, 571 (1981)

KNOWLES, P.F., LEVIN, J.G. und SPRINSON, D.B.: Preparation of 3-Enolpyruvylshikimate 5-Phosphate. In: Methods in Enzymology (Colowick, S.P., Kaplan, N.O., eds.), Vol. 17, 360, Academic Press, New York (1970)

KNOWLES, P.F. und SPRINSON, D.B.: Preparation of Shikimate 5-Phosphate. In: Methods in Enzymology (Colowick, S.P., Kaplan, N.O., eds.), Vol.17, 351, Academic Press, New York (1970)

KOSHIBA, T.: Shikimate Kinase and 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate Synthase in Phaseolus mungo Seedlings.
Z. Pflanzenphysiol. 88, 353 (1978)

KOSHIBA, T.: Organization of Enzymes in the Shikimate Pathway of Phaseolus mungo Seedlings.
Plant Cell Physiol. 20, 667 (1979)

LAEMMLI, U.K.: Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature 227, 680 (1970)

LANZETTA, P.A., ALVAREZ, L.J., REINACH, P.S. und CANDIA, O.A.: An Improved Assay for Nanomole Amounts of Inorganic Phosphate. Anal. Biochem. 100, 95 (1979)

LEIFELD, J.: Anreicherung und Charakterisierung der 5-Enolpyruvylshikimisäure-3-Phosphat Synthase aus Corydalis sempervirens Zellkulturen. Staatsexamensarbeit, Ruhr-Universität Bochum (1982).

LEVIN, J.G. und SPRINSON, D.B.: The Enzymatic Formation and Isolation of 3-Enolpyruvylshikimate-5-Phosphate. J. Biol. Chem. 239, 1142 (1964)

LOWRY, H.O., ROSEBROUGH, N.J., FARR, H.L. und RANDALL, R.J.: Protein Measurement with Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)

LUMSDEN, J. und COGGINS, J.R.: The Subunit Structure of the Arom Multienzyme Complex of Neurospora crassa. A Possible Pentafunctional Polypeptide Chain. Biochem. J. 161, 599 (1977)

MARRIAN, D.H.: The Reactions of Substituted Maleimides with Thiols. J. Chem. Soc. (London) 1515 (1949)

MASSEY, V.: Studies on Fumarase. 2. The Effects of Inorganic Anions on Fumarase Activity. Biochem. J. 53, 67 (1953)

MAURER, H.R.: Discelektrophorese, de Gruyter, Berlin (1968)

MEANS, G.E. und FEENEY, R.E.: Chemical Modification of Proteins, Holden-Day, San Franzisco (1971)

MELOCHE, H.P.: Substrate Analogue Inactivation of 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconic Aldolase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 18, 277 (1965)

MORGAN, P.N., GIBSON, M.I. und GIBSON, F.: Conversion of Shikimic Acid to Aromatic Compounds. Nature 194, 1239 (1962)

MORGAN, P.N., GIBSON, M.I. und GIBSON, F.: The Conversion of Shikimic Acid into Certain Aromatic Compounds by Cell-free Extracts of Aerobacter aerogenes and Escherichia coli. Biochem. J. 89, 229 (1963)

MYRBÄCK, K.: Ober Verbindungen einiger Enzyme mit inaktivierenden Stoffen. II. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 159, 1 (1926)

NIELSSON, G.: Effects of Glyphosate on the Amino Acid Content in Spring Wheat Plants. Swedish J. Agric. Res. 7, 153 (1977)

NIMMO, G.A. und COGGINS, J.R.: The Purification and Molecular Properties of the Tryptophane-sensitive 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-Phosphate Synthase from Neurospora crassa. Biochem. J. 197, 427 (1981)

NOE, W. und SEITZ, H.U.: Induction of de novo Synthesis of Phenylalanine Ammonia-Lyase by L-α-Aminooxy-β-phenylpropionic Acid in Suspension Cultures of Daucus carota L. Planta 154, 454 (1982)

NOWAK, T. und MILDVAN, A.S.: Stereoselective Interactions of Phosphoenolpyruvate Analogues with Phosphoenolpyruvate-utilizing Enzymes. J. Biol. Chem. 245, 6057 (1970)

O'LEARY, M.H., DE GOOYER, W.J., DOUGHERTY, T.M. und ANDERSON, V.: 1-Hydroxycyclopropane Carboxylic Acid Phosphate. A Potent Inhibitor of Enzymes Metabolising Phosphoenolpyruvate. Biochem. Biophys. Res. Commun. 100, 1320 (1981)

PIERCE, J. und SUELTER, C.H.: An Evaluation of the Coomassie Brilliant Blue G-200 Dye-binding Method for Quantitative Protein Determination. Anal. Biochem. 81, 478 (1977)

PRIBIL, R.: Komplexone in der chemischen Analyse, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin (1961)

PUTNAM, A.R.: Fate of Glyphosate in Decidous Fruit Treés.
Weed Sci. 24, 425 (1976)

ROISCH, U. und LINGENS, F.: Wirkung des Herbizids N-Phosphonomethylglycin auf die Biosynthese der aromatischen Aminosäuren.
Angew. Chem. 13, 400 (1974)

ROISCH, U. und LINGENS, F.: Zur Wirkungsweise des Herbizids N-(Phosphonomethyl)glycin. Einfluß von N-(Phosphonomethyl)glycin auf das Wachstum und auf die Enzyme der Aromatenbiosynthese von Escherichia coli.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 1049 (1980)

RUEPPEL, M.L., BRIGHTWELL, B.B., SCHAEFER,J. und MARVEL, J.T.: Metabolism and Degradation of Glyphosate in Soil and Water.
J. Agric. Food Chem. 25, 517 (1977)

SCHNEIDER, F.: Die Funktion des Arginins in den Enzymen.
Naturwiss. 65, 376 (1978)

SCHULZ, A.: Wirkung und Translokation von Glyphosat in Tomatenpflanzen.
Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum (1982)

SLUYTERMAN, A.A. und ELGERSMA, O.: Chromatofocusing: Isoelectric Focusing on Ion-exchange Columns. I. General Principles.
J. Chromatogr. 150, 17 (1978)

SLUYTERMAN, A.A. und WIJDENES, J.: Chromatofocusing: Isoelectric Focusing on Ion-exchange Columns. II. Experimental Verification.
J. Chromatogr. 150, 31 (1978)

SMYTH, D.G., NAGAMATSU, A. und FRUTON, J.S.: Some Reactions of N-Ethylmaleimide.
J. Amer. Chem. Soc. 82, 4600 (1960)

SPECTOR, T.: Refinement of the Coomassie Blue Method of Protein Quantitation. A Simple and Linear Spectrophotometric Assay for ≤ 0.5 to 50 µg of Protein.
Anal. Biochem. 86, 142 (1978)

SPRANKLE, P., MEGITT, W.F. und PENNER, D.: Absorption, Action and Translocation of Glyphosate.
Weed Sci. 23, 235 (1975)

STAUB, M. und DENES, G.: Purification and Properties of the 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate Synthase (Phenylalanine Sensitive) of Escherichia coli K 12. II. Inhibition of Activity of the Enzyme with Phenylalanine and Functional Group-specific Reagents.
Biochim. Biophys. Acta 178, 599 (1969)

STROMINGER, J.L.: Enzymic Transfer of Pyruvate to Uridine Diphosphacetylglucosamine.
Biochim. Biophys.Acta 30, 645 (1958)

TAKAHASHI, K.: The Reaction of Phenylglyoxal with Arginine Residues in Proteins.
J. Biol. Chem. 243, 6171 (1968)

TAKAHASHI, K.: Further Studies on the Reaction of Phenylglyoxal and Related Reagents with Proteins.
J. Biochem. (Tokyo) 81, 403 (1977)

TOI, K., BYNUM, E., NORRIS, E. und HANO, H.A.: Studies on the Chemical Modification of Arginine. 1. The Reaction of 1,2-Cyclohexanedione with Arginine and Arginyl Residues of Proteins.
J. Biol. Chem. 242, 1036 (1967)

TYMONKO, J.M. und FOY, C.L.: Inhibition of Protein Synthesis by Glyphosate.
Plant Physiol. Suppl. 61, 41 (1978)

UOTILA, M., EVJEN, K. und IVERSEN, T.-H.: The Effect of Glyphosate on the Development and Cell Ultrastructure of White Mustard (Sinapis alba L.) Seedlings.
Weed Res. 20, 153 (1980)

VOGEL, H.J. und BONNER, D.M.: Acetylornithinase of Escherichia coli: Partial Purification and Some Properties.
J. Biol. Chem. 218, 97 (1956)

WEBER, K. und OSBORN, M.: The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecylsulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis.
J. Biol. Chem. 244, 4406 (1969)

WEISS, U. und MINGIOLI, E.S.: Aromatic Biosynthesis. XV. The Isolation and Identification of Shikimic Acid 5-Phosphate.
J. Amer. Chem. Soc. 78, 2894 (1956)

YUN, S.-L. und SUELTER, C.H.:Modification of Yeast Pyruvate Kinase by an Active Site-directed Reagent, Bromopyruvate.
J. Biol. Chem. 254, 1811 (1979)

ZEMELL, R.I. und ANWAR, R.A.: Pyruvate-Uridine Diphospho-N-acetylglucosamine Transferase. Purification and Feedback Inhibition.
J. Biol. Chem. 250, 3185 (1975)

Meinen ganz persönlichen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. N. Amrhein für die Oberlassung des Themas, seine stets freundliche Anteilnahme und seine große Unterstützung aussprechen.

Weiter danke ich Herrn G. Bünger, der die Inaktivierungsversuche durchführte, Herrn H. Winking für die Anfertigung der vielen Abbildungen und nicht zuletzt meiner Frau, die diese Arbeit tippte.

L e b e n s l a u f

Am 27. Juni 1952 wurde ich, Hans Christian Steinrücken, als erstes Kind des Arztes Dr. Heinz Steinrücken und seiner Ehefrau, der Ärztin Dr. Ruth Steinrücken, geb. Müller-Bußdorf, in Hamburg geboren.

Von 1959 bis 1963 besuchte ich die Grundschulen in Bad Münster am Stein und Oberglottertal; von 1963 bis 1971 das Kepler-Gymnasium in Freiburg, wo ich am 14. Juni 1971 die Reifeprüfung ablegte.

In der Zeit vom 1. Juli 1971 bis 31. Dezember 1972 leistete ich meinen Wehrdienst bei der Bundeswehr ab.

Im Wintersemester 1972/73 begann ich mit dem Studium der Chemie an der Universität Dortmund. Zum Wintersemester 1974/75 wechselte ich zur Fachrichtung Biologie an der Ruhr-Universität Bochum, wo ich am 17. September 1979 die Diplomprüfung im Fach Biologie ablegte.
Im Oktober des gleichen Jahres begann ich mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. N. Amrhein.

Seit dieser Zeit habe ich am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie der Ruhr-Universität Bochum eine Stelle als wissenschaftliche Hilfskraft inne.